

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz

Angefertigt an der Orthopädischen Universitätsklinik in Heidelberg  
(Prof. Dr. Wiltrud Richter)

*Eignung biologischer versus keramischer Knochenersatzmaterialien  
für die Knochenbildung humaner mesenchymaler Stammzellen*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Pia Maria Voltz  
aus Frankfurt am Main  
München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan

Uni.-Prof.Dr. Joachim Braun

Berichterstatter

Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent/en

Priv. – Doz. Dr. Marlon R. Schneider

Tag der Promotion: 09.Februar 2013



**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	iv
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Der Knochen.....	2
1.2. Knochenzellen .....	4
1.3. Knochenmark .....	5
1.4. Stammzellen .....	6
1.4.1. Mesenchymale Stammzellen .....	7
1.5. Knochenumbau .....	8
1.6. Defektheilung.....	9
1.7. Tissue Engineering .....	10
1.8. Knochenersatzstoffe .....	12
1.8.1. Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien .....	13
1.8.2. Beispiele für Knochenersatzmaterialien .....	14
1.9. Eignung von Knochenersatzstoffen für die humane Knochenheilung .....	22
1.9.1. Tiermodelle.....	22
1.9.2. Einfluss von Form und Partikelgröße.....	23
1.10. Fragestellung / Zielsetzung .....	24
<b>2. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1. Materialien .....	26
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	26
2.1.2. Puffer und Lösungen .....	28
2.1.3. Zellkulturmedien.....	29
2.1.4. Enzyme und Wachstumsfaktoren.....	30
2.1.5. Färbelösungen .....	30
2.1.6. Antikörper .....	30
2.1.7. Kits .....	31
2.1.8. Primer.....	31
2.1.9. Tierhaltungsmaterialien und OP-Bedarf .....	31
2.1.10. Narkosemittel .....	32
2.1.11. Knochenersatzmaterialien .....	33
2.1.12. Verbrauchsmaterialien .....	33
2.1.13. Geräte.....	34

2.1.14. Computer-Software .....	35
2.2. Gewinnung von Knochenmark .....	35
2.3. Zellzahlbestimmung .....	36
2.4. Isolierung mesenchymaler Stammzellen .....	36
2.5. Kultivierung mesenchymaler Stammzellen .....	38
2.6. Nachweis der Multipotenz von MSC in vitro .....	39
2.6.1. Osteogene in vitro Differenzierung von MSC .....	39
2.6.2. Adipogene in vitro Differenzierung von MSC .....	42
2.6.3. Chondrogene in vitro Differenzierung von MSC .....	42
2.7. In vivo Studie der Ektopen Knochenbildung .....	43
2.7.1. Vorbehandlung der Knochenersatzmaterialien .....	43
2.7.2. Herstellung der zellbesiedelten Knochenersatzstoffkonstrukte .....	43
2.7.3. Tierexperimentelle Arbeiten .....	44
2.8. Histologische Untersuchungen .....	47
2.8.1. Fixierung und Einbettung der explantierten Knochenersatzstoff/MSC-Konstrukte .....	47
2.8.2. Fixierung und Einbettung in vitro chondrogen differenzierter MSC .....	47
2.8.3. Herstellen der Paraffinschnitte .....	48
2.8.4. Haematoxylin/Eosin-Färbung .....	48
2.8.5. Nachweis von Nukleinsäuren in Gewebeschnitten .....	49
2.8.6. Immunhistologische Kollagen Typ 2-Färbung .....	51
2.8.7. Nachweis von Proteoglykanen mittels Safranin O – Färbung .....	52
2.8.8. Histomorphometrie .....	52
2.8.9. Statistische Auswertung der in vivo Studie .....	53
2.9. Statistische Untersuchung, Korrelationen .....	54
3. Ergebnisse .....	55
3.1. Charakterisierung von Knochenersatzmaterialien .....	55
3.2. Charakterisierung humaner MSC in vitro .....	57
3.2.1. Osteogene in vitro Differenzierung .....	57
3.2.2. Adipogene in vitro Differenzierung .....	60
3.2.3. Chondrogene in vitro Differenzierung .....	61
3.3. Ektipe Knochenbildung in vivo .....	63
3.4. In Situ-Hybridisierung .....	72
4. Diskussion .....	75

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>95</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>97</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Allgemeine Abkürzungen

Abb	Abbildung (-en)
Aqua dest.	destilliertes Wasser ( <i>aqua destillata</i> )
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
β-TCP	beta- Tricalciumphosphat
bHA	bovines Hydroxylapatit
bHA-C	bovines Hydroxylapatit- Collagen
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
eHA	equines Hydroxylapatit
eHA-C	equines Hydroxylapatit- Collagen
ES	embryonale Stammzellen
et al.	<i>et alii</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>foetal calf serum</i> )
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
i.p.	Intraperitoneal
JPEG	Joint Photographic Experts Group

## Abkürzungsverzeichnis

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MSC	mesenchymale Stammzellen ( <i>mesenchymal stem cells</i> )
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NBT/BCIP	Nitro-blau-tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
Vol.	Volumen
XEM	Xylolersatzmittel

## Einheiten und Vorsätze

cm	Centimeter
CPM	counts per minute
g	Gramm
g	Erdanziehung ( <i>gravity</i> )
h	Stunde
k	Kilo
sec	Sekunde
μ	mikro
m	milli

## Abkürzungsverzeichnis

Mio	Millionen
ml	Millimeter
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen-Konzentration
U	Unit
V	Volt
°C	Grad Celsius

# 1. Einleitung

Knochendefekte mit großem Gewebsverlust, wie beispielsweise als Folge von Unfällen oder nach großflächiger Tumoresektion, stellen ein großes klinisches Problem dar (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). In den meisten dieser Fälle ist eine alleinige Heilung durch knocheneigene Reparaturprozesse nicht möglich. Die Standardbehandlung liegt in der Rekonstruktion der Defektstelle mit autologem Knochen. Den Patienten wird eigene Spongiosa entnommen und diese in die Defektstelle transplantiert (Perry 2009). Häufige Entnahmestellen sind das Becken, Ulna, Tibia, Fibula, Rippen und die Unterkiefersymphyse. Bei kleineren Defekten wird die körpereigene Spongiosa alleine, bei großen Defekten in Kombination mit anderen Ersatzstoffen implantiert (Frauendorf et al. 2007). Vorteile des Materials sind dessen hohe Biokompatibilität und das osteokonduktive, osteogene sowie osteoinduktive Potential (Laurencin 2006). Allerdings ist für die Gewinnung des körpereigenen Materials ein zusätzlicher operativer Eingriff notwendig, der wiederum mit zusätzlichem Infektionsrisiko und einer längeren Operationsdauer verbunden ist (Rueger 1998). Ein weiterer limitierender Faktor ist die begrenzte Verfügbarkeit des Materials, besonders für große Knochendefekte ist die Behandlung mit autologem Material daher oft unzureichend (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Eine Alternative ist die Defektauffüllung mit allogenen Material. Hierbei handelt es sich um Knochen eines anderen Menschen, häufig Knochenstücke, die beim Einsatz von Gelenkimplantaten entfernt werden. Der Knochen wird gereinigt, desinfiziert und in sogenannten Knochenbanken gefriergetrocknet gelagert (Frauendorf et al. 2007). Bei Bedarf wird das Material aufgearbeitet und in den Defekt eines anderen Patienten transplantiert (Kutscher 2008). Die Anwendungshäufigkeit ist jedoch durch die mögliche Übertragung von Krankheitserregern reduziert, auch wenn die Wahrscheinlichkeit dafür nur gering ist (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Der Vorteil im Hinblick auf den Einsatz von autogenem Knochen sind die unbeschränkte Verfügbarkeit und die nicht notwendige Zusatzoperation zur Materialgewinnung (Frauendorf et al. 2007). Die limitierenden Faktoren des allogenen und autogenen Transplantationsmaterials erfordern die Notwendigkeit einer vergleichbaren Alternative. Eine



## 1. Einleitung

vielversprechende Technik stellt hier das *Tissue Engineering* dar.

Mit Hilfe von Zellen, in der Regel mesenchymalen Stammzellen, und unterstützenden Trägermaterialien soll neues Knochengewebe in vitro regeneriert (Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices 2001) und Defektstellen damit rekonstruiert werden. Im Jahr 2007 waren 43 verschiedene synthetische bzw. biologische Trägermaterialien als Knochenersatz auf dem deutschen Markt kommerziell erhältlich. Bislang konnte keines dieser Materialien zu 100% alle gestellten Anforderungen erfüllen (Frauendorf et al. 2007). Daher gilt auch heute, trotz unerwünschter Wirkungen, der Einsatz von allogenen Transplantaten als „Goldstandard“ (Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

### 1.1. Der Knochen

Knochen, als harte Form des Binde- und Stützgewebes, bildet das Skelett. Die feste Beschaffenheit dient dem Schutz und der Stabilisierung lebenswichtiger innerer Organe. Als Ansatzstelle für Muskeln und Sehnen nimmt der Knochen an der aktiven Bewegung teil. Außerdem stellt er ein Stoffwechselreservoir für Mineralsalze dar, das besonders bei chronischem Calciummangel aktiviert wird (Loveridge 1999). Zur Erfüllung dieser Aufgaben hat Knochen einen besonderen Aufbau. Sein Gewebe besteht aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter extrazellulärer Matrix. Er enthält (in Gewicht %) 45% Mineralien, 30% organisches Material und 25% Wasser (Lüllmann-Rauch 2009). Die extrazelluläre Matrix (EZM) liegt zwischen den Zellen, im Interzellularraum des Knochens. Oberflächlich betrachtet dient sie dem Gewebezusammenhalt und gibt dem Knochen Zugfestigkeit und Stabilität. Die Knochenmatrix besteht aus einer festen, mineralischen Phase (überwiegend Hydroxylapatit-Kristalle) mit eingebetteten, flexiblen Kollagenfasern (vor allem Kollagen Typ 1). Weitere Proteine der Knochenmatrix sind z.B. das Osteokalzin, Osteonektin oder Osteopontin; sie können Kalzium binden und spielen daher eine wichtige Funktion im Mineralisierungsprozess des Knochens (Stevens et al. 1997). Kollagen Typ 1 ist aus relativ dicken Kollagenfibrillen aufgebaut, die sich in Form von drei Peptidketten ( $\alpha$ -Ketten) zu einer Tripelhelix umeinander winden (Lüllmann- Rauch

## 1. Einleitung

2009). Hydroxylapatit-Kristalle ( $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times \text{Ca}(\text{OH})_2$ ) sind kleine, hexagonale, druckfeste Mineralkristalle. Sie lagern sich an der Oberfläche oder im Inneren der Kollagenfibrillen an. Die Verbindung von zugfestem Kollagen mit druckfestem Hydroxylapatit verleihen dem Knochen seine Biege- und Zugfestigkeit (Sommerfeldt et al. 2001). Aufgrund der räumlichen Struktur der EZM unterscheidet man Lamellen- und Geflechtknochen (Lüllmann- Rauch 2009).

### **Geflechtknochen**

Sind die Kollagenfibrillen zu Bündeln „verflochten“ und liegen ungeordnet in der Matrix, spricht man von Geflechtknochen. Dieser ist mechanisch schwächer als Lamellenknochen und entsteht, wenn Knochen beispielsweise nach Knochenbrüchen oder während der Entwicklung rasch gebildet wird. Geflechtknochen bildet als besonders zug- und biegungselastischer Knochentyp die Grundsubstanz von Rippen, Wirbelknochen oder Epiphysen. Im Zuge des natürlichen Umbaus wandelt sich Geflechtknochen vollständig in Lamellenknochen um (Lüllmann- Rauch 2009).

### **Lamellenknochen**

Im Lamellenknochen liegen die Kollagenfibrillen in Form von Lamellen organisiert vor. Besonders im Schaftbereich von langen Röhrenknochen, wo eine besondere Festigkeit und Steifheit des Knochens erforderlich ist, besitzt er einen als Kompakta bezeichneten sehr dichten Bezirk (Hench et al. 1993). Charakteristisch für die Kompakta sind als sogenannte Osteone angeordnete Lamellen. Diese bestehen aus einem blutgefäßführenden Zentralkanal, dem Havers-Kanal, mit konzentrisch angeordneten Lamellen. Zwischen einzelnen Haverschen Kanälen bestehen Querverbindungen über sogenannte Volkmann-Kanäle. An den Knochenenden ist die Knochensubstanz weniger kompakt angeordnet und mit vielen Hohlräumen versehen. Sie wird hier als Spongiosa bezeichnet. Die Kombination aus fester Kompakta und lockerer Spongiosa gibt dem Knochen die

## 1. Einleitung

nötige Stabilität bei relativ wenig Gewicht (Sommerfeldt et al. 2001).

### 1.2.Knochenzellen

Drei spezifische Zelltypen kommen im Knochengewebe vor: Matrixproduzierende *Osteoblasten*, knochenabbauende *Osteoklasten* und mit etwa 90% zahlenmäßig am häufigsten vertretene *Osteozyten*.

#### **Osteoblasten**

Osteoblasten entstehen durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen aus mesenchymalen Stammzellen. Die sogenannten „Knochenbildnerzellen“ sezernieren Kollagen Typ 1 und steuern die Mineralisierung (Calciumphosphat- und Calciumcarbonatsynthese). Osteoblasten sind als einschichtige Lage an einer freien knöchernen Oberfläche der mineralisierten Matrix zu finden. So gelangen synthetisierte Substanzen in das Interstitium, um neue Knochenmatrix auf der bereits mineralisierten Matrix aufzubauen. Werden Osteoblasten im Zuge der Mineralisierung des Osteoids eingemauert, entwickeln sie sich weiter zu Osteozyten. Andernfalls können sie bei Fertigstellung der Knochenmatrix in einen Ruhezustand zurückkehren oder sie gehen durch Apoptose zu Grunde (Sommerfeldt et al. 2001, Lüllmann- Rauch 2009).

#### **Osteozyten**

Aus Osteoblasten differenzierte Osteozyten stellen mengenmäßig den größten Anteil der Knochenzellen dar. Da sie im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen keine resorbierenden Aufgaben besitzen, sind sie durch Reduktion der Zellorganellen (z.B. Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum) kleiner als die Osteoblasten. Adulte Osteozyten liegen, von Hohlräumen umgeben, eingebettet in mineralisierter

## 1. Einleitung

Knochenmatrix. Über ihre langen Zellfortsätze sind sie in Knochenkanälchen miteinander verbunden.

Diese wiederum stehen über die Haverschen Kanäle mit dem Blutgefäßsystem in Verbindung (Sommerfeldt et al. 2001, Lüllmann- Rauch 2009).

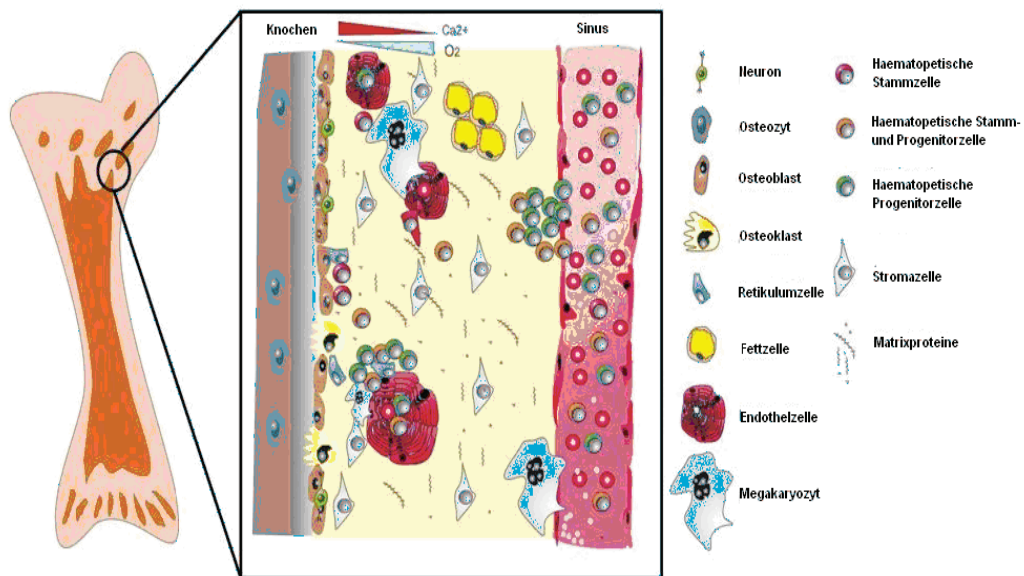
### **Osteoklasten**

Im Gegensatz zu den Osteoblasten und Osteozyten entstammen die knochenabbauenden Osteoklasten dem mononukleären Phagozytose System (MPS) (van Furth et al. 1972). Sie entstehen durch Fusion mononukleärer hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die mehrkernigen Riesenzellen haben einen Durchmesser von 50-100  $\mu\text{m}$  und enthalten bis zu 10 Zellkerne. Ihre Hauptaufgabe ist die Resorption von mineralisiertem Knochen. Sie liegen an der Knochenoberfläche in sogenannten Resorptionslakunen (Howship Lakunen), die durch ihre eigene Aktivität entstehen (Lüllmann- Rauch 2009).

### **1.3.Knochenmark**

Das Knochenmark macht ca. 5% des Körpergewichts aus; es besteht aus einem stark verzweigten Gefäßsinus in einem Stützgerüst aus retikulärem Bindegewebe und füllt die inneren Hohlräume des Knochens aus. Im Knochenmark sind Stammzellen verschiedener Zelllinien in unterschiedlichen Differenzierungsstadien enthalten (Abb. 1). Man unterscheidet blutbildendes rotes Knochenmark und gelbes Fettmark, das sich mit zunehmendem Alter entwickelt und vorwiegend als Energiereservoir dient (Stevens et al. 1997).

## 1. Einleitung



**Abb. 1 Schematische Darstellung undifferenzierter Stammzellen und Knochenzellen im Knochenmark.** Nach Jochen Grassinger, modifiziert, [http://www.uniklinikum-regensburg.de/imperia/md/images/kliniken-institute/haematologie-onkologie/forschung/grassinger/niche\\_big.jpg](http://www.uniklinikum-regensburg.de/imperia/md/images/kliniken-institute/haematologie-onkologie/forschung/grassinger/niche_big.jpg)

### 1.4. Stammzellen

Stammzellen sind Körperzellen, die in verschiedene Zellen und Gewebe ausdifferenzieren können. Sie besitzen die Fähigkeit zur ständigen Selbsterneuerung und Proliferation. Man unterscheidet embryonale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen können in jeden der über 200 Zelltypen des Körpers differenzieren, sie sind pluripotent (Service 2000, Groebner et al. 2006). Undifferenzierte adulte Stammzellen kommen in sonst differenziertem Gewebe oder Organen vor, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen haben sie nur ein limitiertes Repertoire von Zelltypen, in die sie differenzieren können, sie sind multipotent (Service 2000). Im Knochenmark sind zwei Arten solcher Stammzellen vertreten: Zum einen sind dies hämatopoetische Stammzellen als Vorläufer aller Arten von Blutzellen, wie Erythrozyten, Thrombozyten oder Leukozyten, zum anderen multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC), welche als Vorläuferzellen für alle Arten von mesenchymalem Gewebe dienen. Sie spielen eine Rolle beim Aufbau von Knochen, Knorpel, Muskel, Fettgewebe und

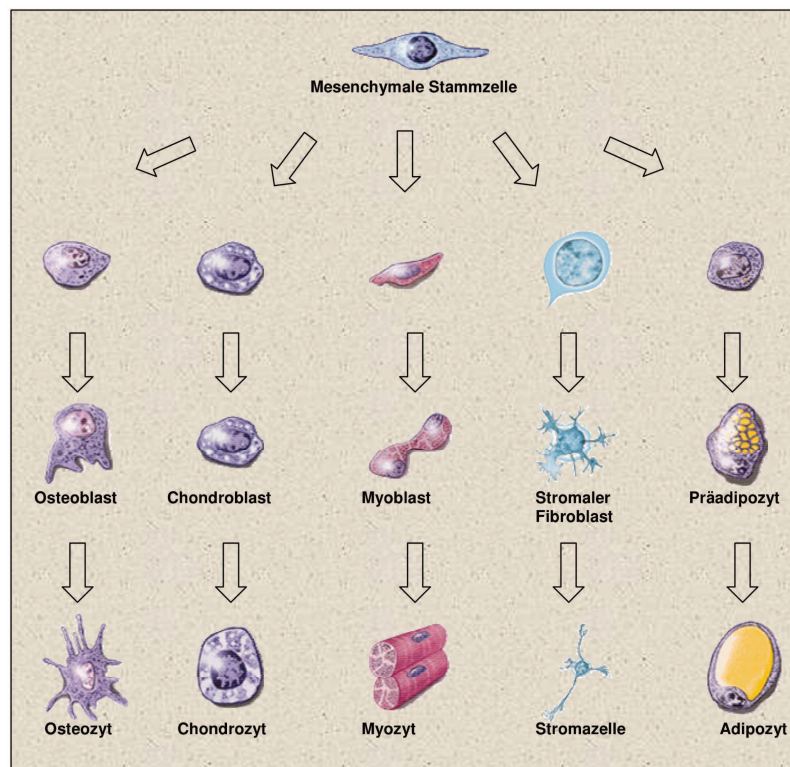
## 1. Einleitung

Bindegewebe, sowie Sehnen und Bändern. Durch die Bildung von Knochenmarkstroma unterstützen sie außerdem die Hämatopoese (Bonfield 2010, Groebner et al. 2006). Da im Rahmen des *Tissue Engineering* während der Knochenregeneration MSC als knochenbildende Zellen besonders relevant sind, wird im Folgenden näher auf diese eingegangen.

### 1.4.1. Mesenchymale Stammzellen

In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts gelang Friedenstein und seinen Kollegen die Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspiraten. Sie konnten demonstrieren, dass MSC in vivo in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren können (Friedenstein et al. 1966, 1968, 1974). In den folgenden Jahren nahm das biologische und klinische Interesse an MSC stetig zu. Im Zuge dessen wurden MSC aus den unterschiedlichsten Geweben isoliert und zahlreiche neue Methoden für ihre Isolierung und Expansion entwickelt. Dies führte zu Unstimmigkeiten der Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Ergebnisse, woraufhin die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISTC) Kriterien zur Definition humaner mesenchymaler Stammzellen erstellt hat. Zunächst müssen sie unter Standardkulturbedingungen in der Lage sein, an der Oberfläche ihres Zellkulturgefäßes zu adhären. Außerdem müssen mehr als 95% der Zellen einer MSC-Population die Oberflächenproteine CD105, CD73 und CD90 exprimieren. Gleichzeitig dürfen sie die Oberflächenproteine CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA Klasse 2 nicht besitzen. Zuletzt müssen die Zellen in der Lage sein, unter standardisierten Kulturbedingungen in vitro zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Dominici et al. 2006) (Abb. 2).

## 1. Einleitung



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Differenzierungsfähigkeit humaner MSC.** MSC können in vitro unter geeigneten Bedingungen zu Chondrozyten, Osteozyten, Myozyten, Stromazellen oder Adipozyten differenzieren. Der Nachweis der Multipotenz ist eine Standardmethode zur Charakterisierung humaner MSC. Modifiziert aus: Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Pittenger Mark und Marshak Daniel in: Stem cell biology. Marshak Daniel, Gardner Richard und Gottlieb Daniel, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001).

Werden MSC unter geeigneten Kulturbedingungen differenziert, können nach entsprechender Kultivierungsdauer Osteoblasten mit einer Alizarin-Rot-Färbung, Adipozyten mittels Ölrot O-Färbung und Chondrozyten immunohistochemisch durch ihre Kollagen Typ 2-Ablagerung nachgewiesen werden (Dominici et al. 2006).

### 1.5.Knochenumbau

Im Wachstum wird zunächst Geflechtknochen gebildet, der durch Osteoblasten und Osteoklastentätigkeit in Lamellenknochen umgebaut wird und so seine



## 1. Einleitung

endgültige Form und Stabilität erhält. Außerdem können Osteoblasten und Osteoklasten im Rahmen des kontinuierlich stattfindenden Umbaus durch Osteozyten oder hormonelle Signale aktiviert werden. Ihre Tätigkeit ermöglicht dem Knochen, sich funktionell an wechselnde mechanische Belastungen anzupassen. Mikroläsionen können so repariert werden. Im gesunden Körper befindet sich der Ab- und Aufbau von Knochensubstanz stets im Gleichgewicht (Raiz et al. 1999, Lüllmann-Rauch 2009).

### 1.6. Defektheilung

Eine Fraktur (Fractura, Knochenbruch, Bruch) ist ein Kontinuitätsverlust des Knochenzusammenhangs, meist als Folge von Traumata (Wiesner et al. 1999). Knochen besitzt die Fähigkeit, sich selbst zu regenerieren und die alte Form und Beschaffenheit wieder zu erlangen. Im Gegensatz zu Weichteilgewebe heilt Knochengewebe ganz ohne Narbenbildung ab. Grundsätzlich können zwei Arten der Defektauffüllung unterschieden werden: Mechanisch stabile Defekte heilen direkt (desmale Ossifikation); dabei entwickelt sich Granulationsgewebe zu straffem Bindegewebe, aus dem ohne Zwischenstufen Lamellenknochen aufgebaut werden kann. Voraussetzungen sind eine intakte Durchblutung, die stabile Überbrückung des Frakturspaltes, sowie eine exakte anatomische Lage der Fraktarenden (Schenk et al. 1977). Bei mechanisch instabilen Defekten wird zunächst eine knorpelige Zwischenstufe aus hyalinem Knorpel gebildet, der in weiteren Schritten durch Knochengewebe ersetzt wird (chondrale Ossifikation). Die Defektstelle wird zunächst mit Gewebsflüssigkeit und Blut aufgefüllt, das entstandene Gerinnsel organisiert sich zu Granulationsgewebe, woraus sich, als provisorischer Verschluss, eine Narbe aus Binde- und Knorpelgewebe entwickelt (knorpeliger Kallus). Währenddessen wird an den Enden des Frakturspaltes durch Osteoklasten avitales Bindegewebe abgebaut. Das Knorpelgewebe der entstandenen Narbe wird nach und nach durch Knochengewebe ersetzt. Innerhalb von Wochen entsteht so eine zunächst aus Geflechtknochen bestehende, dicke knöcherne Narbe (Kallus), die in vielen Monaten schließlich zu Lamellenknochen umgebaut wird (Bruder et al. 1999, Lüllmann-Rauch 2009).



## 1. Einleitung

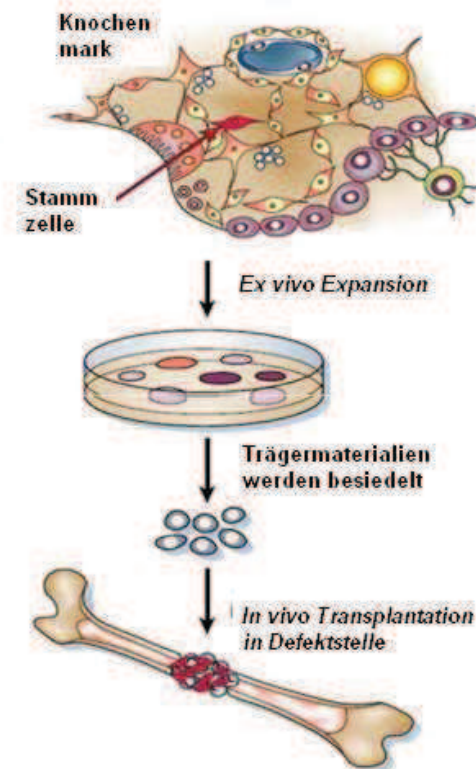
### Grenzen der Knochenheilung

Überschreitet ein Knochendefekt eine bestimmte Größe und das Individuum ist zeitlebens nicht in der Lage, den Defekt über die natürliche Wundheilung zu überbrücken, so spricht man von einem Defekt kritischer Größe (*critical size defect*) (Schmitz et al. 1986). Weitere Grenzen sind der natürlichen Frakturheilung bei mangelnder Stabilität durch unzureichende Fixation der Frakturrenden oder unzureichender Blutversorgung gesetzt. In diesem Fall kann es zur Ausbildung von sogenannten Pseudoarthrosen (Falschgelenke) kommen. Die knöcherne Frakturheilung bleibt aus, stattdessen kommt es zur fibrösen Verbindung der Bruchenden (Wiesner et al. 1999). In solchen Situationen ist eine Heilung meist nur durch eine Defektauffüllung zu erreichen. Bei etwa 15% aller operativen Eingriffe am Skelettsystem werden zur Wiederherstellung der natürlichen Knochenform und der Knochenfunktion Knochenersatzstoffe eingesetzt. Knochen ist damit beim Menschen nach Haut das am zweit häufigsten transplantierte Gewebe (Service 2000).

### 1.7. Tissue Engineering

Eine interessante und vielversprechende Alternative für die klassische Rekonstruktion von Knochendefekten mit allogenem oder autogenem Material stellt das Tissue Engineering dar. Es handelt sich um ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches Material- und Biowissenschaften mit der klinischen Forschung zur Entwicklung lebender Substitute von Gewebedefekten vereinigt (Langer et al. 1993, Vacanti et al. 1995). Biologische Gewebe werden durch gerichtete Kultivierung von Zellen mit Hilfe geeigneter Trägermaterialien oder Biomoleküle in vitro hergestellt und können in die Defektstelle des Patienten transplantiert werden (Abb. 3)

## 1. Einleitung



**Abb. 3 Ex vivo Generation von Knochengewebe.** Schematische Darstellung des Tissue Engineering zur Regeneration von Knochengewebe. Mesenchymale Stammzellen werden in vitro kultiviert, dreidimensionale Trägermaterialien damit besiedelt und in die geschädigte Region gebracht. Dort differenzieren die Stammzellen zu Osteoblasten und regenerieren den geschädigten Knochen. Modifiziert nach Bianco 2001.

Breiten Einsatz findet diese Technik von der Herstellung artifizieller Herzklappen über die ex vivo Herstellung von Nasenknorpel bis hin zum kompletten Organersatz wie der Harnblase (Bianco et al. 2001). Die Vorbehandlung des Biomaterials ermöglicht durch in situ Modellierung eine optimale Anpassung an die Defektstelle (Schaefer et al. 2004) und stellt daher eine vielversprechende Methode auch zum Einsatz in der Regeneration von Knochendefekten dar.

Grundsätzlich sind für die Neubildung von Knochengewebe im Rahmen des Tissue Engineering folgende Grundelemente erforderlich (Schmidt-Rohlfing et al 2009):

## 1. Einleitung

### 1. ein strukturelles Gerüst (Knochenersatzstoffe)

### 2. Zellen:

Für das Tissue Engineering von Knochengewebe werden hauptsächlich aus Knochenmarkaspiraten isolierte mesenchymale Stammzellen (MSC) eingesetzt. Vorteil der MSC sind ihre immunsuppressiven Eigenschaften, eine hohe Teilungsrate und die Fähigkeit, in unterschiedliche Zellrichtungen zu differenzieren. Auch bereits differenzierte Osteoblasten wurden verwendet; sie besitzen eine schnelle und effektive Defektheilung, sind allerdings nur noch begrenzt teilungsfähig, was ihren Einsatz limitiert (Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

### 3. Wachstumsfaktoren

## **1.8. Knochenersatzstoffe**

Sehr große Knochendefekte oder solche mit großem Weichteilschaden wie beispielsweise nach Traumata, durch Infektionen, nach Tumorresektionen oder auch bei Risikopatienten (Raucher, Diabetiker, Immunsupprimierte) heilen oft nur unbefriedigend oder resultieren in Pseudoarthrosen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). In den meisten dieser Fälle ist eine Heilung nur durch eine Auffüllung mit Knochenersatzstoffen zu erreichen (Service 2000). Diese Materialien werden definiert als „nicht körpereigene Substanzen, die nach Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren Funktionen ersetzen“ (Rueger 1998). Biomaterialien zum Knochenersatz sollen die Menge, Qualität und Bildungsgeschwindigkeit von neuem Knochengewebe während der Defektheilung positiv beeinflussen (Rueger 1998). Sie sollten der ursprünglichen Knochenmatrix ähneln, um Zellen eine knochenspezifische Umgebung zur Zellproliferation und Ablagerung einer extrazellulären Matrix bieten zu können. Zahlreiche Materialien und Materialkombinationen sind auf dem Markt erhältlich (Bauer et al. 2000). Ein ideales Knochenersatzmaterial ist biokompatibel, osteokonduktiv, osteoinduktiv, bioresorbierbar, einfach anzuwenden, kosteneffektiv und strukturell natürlichem Knochen ähnlich (Kolk et al. 2012).

## 1. Einleitung

### 1.8.1. Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien

**Biokompatibilität:** Die wichtigste Anforderung an ein Knochenersatzmaterial ist dessen Biokompatibilität (*bios* = leben, *kompatibel* = verträglich). Da implantierte Ersatzstoffe über einen langen Zeitraum in engem Kontakt mit dem umliegenden Gewebe stehen, dürfen sie keine immunologischen Abwehrreaktionen hervorrufen, die zur Zerstörung des Transplantats führen könnten (Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

**Biodegradation:** Die Abbaurate sollte auf die Wachstumsrate des neuen Gewebes abgestimmt sein, sodass bei vollständiger Regeneration des Knochengewebes das Trägermaterial idealerweise komplett abgebaut ist. So kann ein zusätzlicher Eingriff zur Implantatentfernung vermieden werden (Gleeson et al. 2011).

**Osteokonduktion:** Trägermaterialien dienen Osteoblasten als Leitschiene, entlang der sie in den Defekt einwachsen können. Diese Eigenschaft wird als Osteokonduktion bezeichnet. Die Anlagerung, Proliferation, Differenzierung sowie Migration von Knochenvorläuferzellen gelingt nur bei geeigneter Oberflächenstruktur, Biokompatibilität, Porosität und chemischer Beschaffenheit des Biomaterials (Terheyden 2000, Schmidt-Rohlfing et al. 2008).

**Osteoinduktion:** Die Fähigkeit von implantierten Trägermaterialien, die Proliferation und Differenzierung der Progenitorzellen in Osteoblasten zu gewährleisten, wird als Osteoinduktion bezeichnet. Die Osteoinduktion wird durch osteoinduktive Proteine, sogenannte bone morphogenetic proteins (BMP), gesteuert (Terheyden 2000).

**Mechanische Stabilität:** Um auftretenden Belastungen ausreichend Widerstand leisten zu können, sollte das Gerüst entsprechende mechanische Stabilität aufweisen und gleichzeitig die Zwischenräume für das Einwachsen von Zellen und die Matrixproduktion aufrechterhalten (Hutmacher 2000, Bianco et al. 2001, Laurencin et al. 2006, Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Um eine rasche Remobilisierung des Patienten zu gewährleisten, sollte der Ersatzstoff idealerweise die gleichen mechanischen Eigenschaften wie natürlicher Knochen aufweisen (Hutmacher 2000).

## 1. Einleitung

**Poren:** Die Porosität ist definiert als Hohlraumvolumen pro Gesamtvolumen eines Stoffes. Der Grad der Porosität hat einen direkten Einfluss auf ein erfolgreiches Zellwachstum, ausreichende Nährstoffversorgung, den Abtransport von Stoffwechselprodukten und die Vaskularisierung während der Bildung des neuen Knochengewebes (Schnürer et al. 2003).

Die Porengröße ist entscheidend für die Zellbesiedlungseffizienz im Trägermaterial (O'Brien et al. 2005). Bei zu kleiner Porengröße können die Zellen nicht schnell genug in das Zentrum des Implantats einwandern oder dieses homogen besiedeln. Die Zellen siedeln sich in der Peripherie der Matrix an und stellen damit eine Barriere für weitere Zellinfiltration dar. Als Folge kann es zu einer Nekrose im Zentrum des Implantats kommen (Ko et al. 1997, Phelps et al. 2009, Gleeson et al. 2011). Auf der anderen Seite ist bei zu großen Poren die spezifische Oberfläche des Trägermaterials reduziert und folglich die Zelladhäsion limitiert (Byrne et al. 2008, Murphy et al. 2010). Ein ideales Trägermaterial hat ein offenes Netzwerk aus Poren, die miteinander in Verbindung stehen, also einen hohen Grad an Porosität (>90%) bei geeigneter Porengröße. So ist eine gute Interaktion mit den Zellen und eine Integration des neu gebildeten Knochengewebes in das Implantatlager gewährleistet (Freyman et al. 2001).

### 1.8.2. Beispiele für Knochenersatzmaterialien

#### 1.8.2.1. Keramiken

Zu den Keramiken (anorganische, nicht-metallische Materialien) zählen Kalziumphosphate, Biogläser und Glaskeramiken (Hench 1998). Keramiken werden häufig als Knochenersatzstoffe eingesetzt, da ihre Beschaffenheit der mineralischen Phase des natürlichen Knochens sehr ähnelt (Hing 2005). Auf Kalziumphosphatderivaten basierende Materialien wie Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit (HA) sind die am häufigsten als Knochenersatzstoffe eingesetzten Keramiken, sie werden aus natürlichen oder synthetischen Ausgangsstoffen gewonnen. (Rueger 1998, Anderegg et al. 1999). Sowohl HA

## 1. Einleitung

als auch TCP haben osteokonduktive Eigenschaften, sind biokompatibel, ohne immunogene oder toxische Nebeneffekte (Schnürer et al. 2003, Wahl et al. 2006, Kolk et al. 2012). Ihnen fehlen osteogene und osteoinduktive Eigenschaften, sie zeigen nur eine geringe strukturelle Abstützung zu Beginn der Implantation. Kommen sie mit natürlichem Knochen in Kontakt, wird direkt an der Oberfläche der Keramik neue Knochenmatrix produziert; diese mineralisiert und schließlich entsteht durch *remodelling* neuer Knochen (Schnürer et al. 2003, Kamitakahara et al. 2008).

### Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HA) ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) ist die anorganische Grundsubstanz von Knochen und macht etwa Zweidrittel der Trockensubstanz von Knochengewebe aus. Es besteht aus Calciumphosphat (85-95%), Calciumcarbonat (8-10%), Magnesiumphosphat (1,5%) und Calciumfluorid (0,5%). HA-Keramiken sind dem im Knochen vorkommenden, natürlichen HA chemisch nahezu identisch. Bei einem entsprechenden Calciumphosphat-Verhältnis von 1,67 werden Calcium und Phosphat-Ionen in den Organismus freigesetzt, somit ist HA bioaktiv (Schnürer et al. 2003). Es wird vor allem wegen der osteoinduktiven Eigenschaften kommerziell zur Knochenrekonstruktion eingesetzt (Rodrigues et al. 2003, Gleeson et al. 2011). Häufig werden Implantate mit HA beschichtet, um ihre Integration ins umgebende Knochengewebe zu fördern und dadurch die Knochenheilung einzuleiten (Gleeson et al. 2011). Man unterscheidet biologisches HA, das aus Korallen oder tierischem Knochen gewonnen wird und synthetisches (Kolk et al. 2012). Natürliche HA-Keramiken besitzen eine für invasierende Zellen leicht zu besiedelnde innere Oberfläche mit interkonnektierendem Porensystem bei geeigneter Poren- und Partikelgröße. Dies bewirkt eine gute Biointegration, das heißt der neue Knochen kann das Material vollständig durchwachsen. Synthetisches HA wird in bestimmten Herstellungsverfahren so bearbeitet, dass die Porosität ebenfalls der natürlichen entspricht (Schnürer et al. 2003). Im Knochen implantiert gehen HA-Keramiken eine feste Bindung mit dem umliegenden Gewebe ein. Die Anwendung von HA als Knochenersatzstoff hat

## 1. Einleitung

allerdings in den letzten Jahren durch die sehr langsame Abbaurate an Popularität verloren (Gleeson et al. 2011). Als Folge der langen Verweildauer im Gewebe kann die Entstehung sogenannter osteoimplantärer Verbände gefördert werden, die möglicherweise zu Belastungsspitzen innerhalb des Knochens führen (Rueger 1998), wodurch die Gesamtstabilität in belasteten Implantatlagern nur unzureichend ist (Epple et al. 2007).

### **Tricalciumphosphate**

Tricalciumphosphate (TCP) ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) zeichnen sich durch ihre gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität aus. Das Ca/P-Verhältnis von TCP ist 3:2. Man unterscheidet synthetisch hergestelltes  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCP. Reines  $\alpha$ -TCP hat eine Abbaurate von bis zu 24 Monaten.  $\alpha$ -TCP selbst ist löslich, jedoch wandelt sich ein Teil spontan in HA um und ist noch nach Jahren im Röntgenbild am Implantationsort nachweisbar (Wiltfang et al. 2002). Für  $\beta$ -TCP ist diese Umwandlung nicht beschrieben (Schnürer et al. 2003). Durch die Bindung von  $\beta$ -TCP an angrenzenden Knochen werden Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität stimuliert.  $\beta$ -TCP wird so innerhalb weniger Monate vollständig abgebaut während neuer Knochen in das Implantat einwächst (Ducheyne et al. 1993, Gleeson et al. 2011, Kolk et al. 2012). Allerdings kann ein zu schneller Abbau des  $\beta$ -TCP zu einer entzündlichen Reaktion mit bindegewebiger Durchwachsung der Defektstelle führen, was die mechanische Stabilität reduziert (Wiltfang et al. 2002).

### **Biphasische HA/TCP**

Zur Optimierung der Abbaurate werden HA/TCP-Keramiken kombiniert eingesetzt (Schnürer et al. 2003). Ziel ist es gemäß den Eigenschaften der beiden Ausgangssubstanzen einerseits den Abbau der Implantate zu fördern und andererseits die Entstehung von osteoimplantären Verbänden zu reduzieren, um so die Stabilität zu erhöhen. Das Verhältnis HA/TCP ist variabel und entscheidend für die Geschwindigkeit der Resorption (Trecant, et al. 1996, Schnürer et al. 2003). In

## 1. Einleitung

einigen Studien wurde allerdings nachgewiesen, dass die Integration in den Knochen durch die Kombination nicht verbessert werden konnte und die Mischung eher zu Lasten der mechanischen Eigenschaften der Einzelsubstanzen ging (Rueger 1998).

### 1.8.2.2. Natürliche Polymere

Natürliche Polymere zeichnen sich vor allem durch ihre Biokompatibilität, die Resorbierbarkeit und ihre Bioaktivität aus. Die eingesetzten Materialien bilden die Basis aller Organsysteme im natürlichen Organismus. Werden sie in einen fremden Organismus implantiert, erkennt das Immunsystem des Wirtes das Material nicht als fremd, Immunreaktionen können so reduziert oder sogar völlig unterdrückt werden. Außerdem werden natürliche Polymere durch die körpereigenen Prozesse leicht abgebaut, ohne dass toxische Nebenprodukte entstehen. Durch chemische und physikalische Prozesse kann die Struktur der Polymere so verändert werden, dass sich die Resorptionsrate individuell auf regenerative Prozesse einstellen lässt. Für die Rekonstruktion von Knochendefekten werden beispielsweise Alginat, Chitosan, Fibrin, Glykosaminoglykane oder Kollagene alleine oder in Kompositen eingesetzt (Gleeson et al. 2011).

### Kollagen

Als Bestandteil von Knochenersatzmaterialien kommt dem Kollagen zunehmend Bedeutung zu. Das natürliche Polymer kommt beispielsweise in Knochen (Kollagen Typ 1), Knorpel (Kollagen Typ 2) oder in Wänden von Blutgefäßen (Kollagen Typ 3) vor. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein in der EZM des menschlichen Körpers (>30%), im Knochengewebe bildet es den Hauptanteil der organischen Phase. Zur Rekonstruktion von Knochendefekten wird das im natürlichen Knochen vorkommende Kollagen Typ 1 eingesetzt. Zum Einsatz als Knochenersatzmaterial kann Kollagen von verschiedenen Tierspezies



## 1. Einleitung

(z.B. Rind, Schwein, Pferd) durch Enzymbehandlung aus deren EZM isoliert und gereinigt werden. Als Trägermaterial ist es aufgrund seiner Biokompatibilität, der Immunogenität, Zelladhäsion und Proliferation ideal (Wahl et al. 2006). Die klinische Anwendung als Trägermaterial ist allerdings durch die mangelhafte Stabilität limitiert, im Rahmen des Tissue Engineering wird Kollagen daher stark quervernetzt oder beispielsweise in Kombination mit Hydroxylapatit eingesetzt (Berry et al. 2004, O'Brien et al. 2005, Wahl et al. 2006, Byrne et al. 2008, Murphy et al. 2010, Choi et al. 2011, Gleeson et al. 2011). Durch den Zusatz von Kollagen zu HA ist das Material weniger spröde als reines HA und verfügt im Vergleich über eine bessere Zug- und Druckfestigkeit, also eine höhere mechanische Belastbarkeit. Dies ist ein Vorteil für das klinische Handling, z.B. besseres Einarbeiten des Materials in den Defekt, das Material kann unter leichtem Druck appliziert werden ohne zu brechen. Außerdem erhöht das natürliche Kollagen die Biofunktionalität; dies führt zu einer besseren Zellbesiedlung, Vaskularisierung und Gewebeintegration (Wahl et al. 2006, Gleeson et al. 2010).

### 1.8.2.3. Komposite

Da keines der oben aufgeführten Materialien alleine alle Anforderungen, die an einen idealen Knochenersatzstoff gestellt werden erfüllt, wurden sogenannte Komposite entwickelt. Die Kombination einer oder mehrerer Einzelstoffe soll die nicht ausreichende Wirkung der Primärsubstanz fördern (Rueger 1998). Idealerweise haben Komposite osteokonduktive, osteogene und osteoinduktive Eigenschaften. (De Boer et al. 2003). Eine vielversprechende Kombination sind Hydroxylapatit und Kollagen Typ 1. Entsprechend der natürlichen Knochenzusammensetzung wird bei Implantation dieses Komposits in Knochendefektstellen eine identische, natürliche Reaktion erwartet. Die extrazelluläre Umgebung für osteogene Zellen soll so optimiert werden, dass eine schnelle Entwicklung von Knochengewebe erreicht werden kann. Komposite sollen nicht nur als Trägermaterialien fungieren sondern auch eine aktive Rolle in der Entwicklung von neuem Gewebe spielen (Gleeson et al. 2011). Eine Kombination aus Kollagen, Knochenmark und Keramik erfüllt zum großen Teil die

## 1. Einleitung

Anforderungen die an ein ideales Knochenersatzmaterial gestellt werden. Sowohl Kollagen Typ 1 als auch Hydroxylapatit erhöhen alleine die Osteoblasten-Differenzierung (Xie et al. 2004, Kolk et al. 2012). Wurde Kollagen Typ 1 mit Hydroxylapatit kombiniert eingesetzt, konnte eine beschleunigte Osteogenese beobachtet werden (Wahl et al. 2006). Durch Einbettung von Osteoblasten in eine HA-Kollagen-Matrix konnte eine bessere osteokonduktive Wirkung im Vergleich zu monophasischem HA beobachtet und gleichzeitig eine der Knochenmatrix identische Kalzifizierung der extrazellulären Matrix verzeichnet werden (Wang et al. 1995). In diversen in vivo Studien wurde die Biokompatibilität des HA-Kollagen- Komposits sowohl im Tier als auch im Menschen nachgewiesen (Serre et al. 1993, Scabbia et al. 2004). Die Kombination von mechanisch stabilem HA mit flexiblem und geschmeidigem Kollagen erhöht die Resistenz und Stabilität des Materials und erleichtert gleichzeitig die Applikation (Yamauchi et al. 2004). Im Vergleich zu anderen Polymeren mit Abbauraten von bis zu 2 Jahren haben HA-Kollagen-Komposite eine moderate Abbaurate von 2 Monaten bis zu einem Jahr (Johnson et al. 1996). Parameter wie Größe und Verformbarkeit, eine erhöhte Adhäsion der Partikel an die Defektwand und die Begünstigung der Stabilisierung durch Verklumpung des Materials (Johnson et al. 1996) sorgen für eine gute Handhabung während der Implantation. In Kompositen verwendetes HA kann aus dem Knochen gewonnen oder chemisch hergestellt werden. In diesen Kompositen werden HA und Kollagen als Einzelkomponenten zusammen gemischt. Ein Problem ist hierbei die homogene Verteilung und die Ausbildung der Porenstruktur, dies soll durch besondere Herstellungsverfahren gewährleistet werden (Gleeson et al. 2010; Wahl et al. 2006).

### 1.8.2.4. Biologische Knochenersatzstoffe

Biologische Knochenersatzstoffe werden aus tierischen Knochen (z.B. Pferd, Rind) oder beispielweise Korallen (Buchholz et al. 1987, Khan et al. 2000) gewonnen. Materialien aus tierischem Knochen sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum humanen Knochen hervorragend dazu geeignet die Bildung von neuem Knochengewebe zu fördern und die Gewebeheilung im menschlichen Körper zu

## 1. Einleitung

fördern. Es handelt sich um Naturprodukte, die bei der Heilung in das Gewebe und in den körpereigenen Stoffwechsel langsam integriert werden. Dabei entstehende Abbauprodukte sind nicht toxisch und werden vom Körper meist resorbiert. Abstoßungsreaktionen durch das Wirtsgewebe werden aufgrund der guten Biokompatibilität drastisch reduziert oder fehlen gänzlich (Gleeson et al. 2010, Smeets et al. 2010).

### **Bovine Spongiosa, Hydroxylapatit und Kollagen (bHA-C)**

Ein vielfältig zur Rekonstruktion von Knochendefekten eingesetztes Knochenersatzmaterial wird aus bovinem Knochen durch Elutionsprozesse gewonnen (Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen) (Meyer et al. 2007). Es besteht aus Kollagen (ca. 33%) und biologischem Calcium-Hydroxylapatit (66%). Die Porosität liegt bei 50-70%, bestehend überwiegend aus Makroporen (150-600µm) (Herstellerangaben). Die Abtötung von Viren, Prionen und Bakterien sowie eine Reduktion des antigenen Potentials werden durch zahlreiche Inaktivierungsschritte während des Herstellungsprozesses gewährleistet. Endprodukt ist eine zellfreie bovine Matrix mit natürlichem Kollagen Typ 1, dessen ursprüngliche Eigenschaften durch den Herstellungsprozess nicht verloren gehen (Albrektsson et al. 1981, Frost et al. 1989, Meyer et al. 2007). In der Defektstelle soll bHA-C temporär den Defekt überbrücken um dann in das umgebende Knochengewebe integriert zu werden (Meyer et al. 2007).

### **Bovines Hydroxylapatit (bHA)**

Bei bHA handelt es sich um aus dem Oberschenkelknochen von Rindern gewonnene Spongiosa, die zur Entfernung aller organischen Materialien einem zusätzlichen Erhitzungsprozess bis auf 300°C unterzogen wird. So besteht dieser Ersatzstoff ausschließlich aus Hydroxylapatit. bHA ist osteokonduktiv und gehört zu den langsam biodegradierbaren Knochenersatzmaterialien (Hauschild et al. 2004). In einem patentierten Herstellungsprozess wird das Material so bearbeitet,

## 1. Einleitung

dass die Mikrostruktur dem natürlichen Knochen ähnelt, so kann es in den natürlichen Regenerationsprozess des körpereigenen Knochens integriert werden (Smeets et al. 2010). Es besteht aus Nano- (10-20 nm) und Makroporen (100-400 µm), welche miteinander in einem schwammartigen Netzwerk in Verbindung stehen. Klinische Anwendung findet dieses Material zur Stabilisierung des Blutkoagulum, zur Einleitung der Knochenheilung sowie zur Regeneration von Sinusaugmentationen, außerdem wird es vielseitig in der Oralchirurgie eingesetzt (Handschele et al. 2009, Smeets et al. 2010).

### **Equines Hydroxylapatit Kollagen (eHA-C)**

Bisher sind vor allem aus Rinderknochen gewonnene Knochenersatzmaterialien erhältlich. Sie werden bereits vielseitig eingesetzt, allerdings stossen sie aufgrund der immer wieder aktuellen Diskussion über Prionenerkrankungen auf Ablehnung durch den Patienten (Hauschild et al. 2004). Eine mögliche Alternative stellen Materialien aus Pferdeknochen dar, die alle Vorteile der biologischen Materialien besitzen ohne die angeführten Nebeneffekte. Die Firma Geistlich Pharma hat ein Knochenersatzmaterial entwickelt, dass in einem speziellen Verfahren aus dem Oberschenkelknochen von Pferden gewonnen wird. In einem patentierten Prozess wird es schonend aufgereinigt, sodass die natürliche Knochenstruktur erhalten bleibt. Ergebnis ist ein auf equinem Hydroxylapatit und Kollagen basierender Knochenersatzstoff. Das Material wird von einem bipolaren System aus miteinander verbundenen Nano- (10-20 nm) und Makroporen (100-400 µm) durchzogen. Dies vergrößert die Oberfläche des Materials, ermöglicht die Vaskularisierung und erhöht die Kapillarität bei gleichzeitiger Hydrophilie (Geistlich Pharma). Durch die Kombination von hoch porösem und biokompatiblen Kollagen zu osteokonduktivem Hydroxylapatit soll vor allem das Einwachsen von neuem Knochengewebe beschleunigt werden (Zecha et al. 2011).

## 1. Einleitung

### **Equines Hydroxylapatit (eHA)**

Equines Hydroxylapatit (eHA) wird in einem identischen Verfahren wie eHA-C aus dem Oberschenkelknochen von Pferden gewonnen und zusätzlich, zur Entfernung des enthaltenen Kollagens, Elutionsprozessen unterzogen. Das Material besteht aus einem interkonnektierendem Porensystem aus Nano- (10-20 nm) und Makroporen (100-400 µm).

## **1.9.Eignung von Knochenersatzstoffen für die humane Knochenheilung**

### **1.9.1. Tiermodelle**

Um die Knochenbildungsfähigkeit verschiedenster Knochenersatzmaterialien zu untersuchen, existieren ektope (Krebsbach et al. 1997, Muraglia et al. 1998) und orthotope (Gebhart et al. 1991, Purleacher et al. 1996, Wippermann et al. 1999, Quarto et al. 2001) Implantationsmodelle. Im orthotopen (engl. *orthotopic*: an normaler Stelle) Tiermodell werden Trägermaterialien direkt in gesetzte Knochendefekte implantiert, um neues Knochengewebe aufzubauen (Petite et al. 2000, Krut et al. 2004, van Gaalen et al. 2004), so kann die *de novo* Knochenbildung durch eine stärkere Vaskularisierung und höhere mechanische Kräfte als im ektopen Tiermodell beeinflusst werden (Kasten et al. 2004).

Das ektope (gr. *ektopia* „Außerörtlichkeit“) Tiermodell erlaubt auf eine einfache Art die Untersuchung der *in vivo* Osteogenese; Trägermaterialien werden mit Zellen besiedelt, subkutan in immundefiziente Tiere implantiert und die Knochenbildung histologisch beurteilt. Nach der Expansion *in vitro* sind MSC vieler Spezies in der Lage im ektopen Tiermodell Knochen zu bilden (Friedenstein et al. 1974, Kuznetsov et al. 1989, Ripamonti 1996, Krebsbach et al. 1997, Mankani et al. 2001). Krebsbach et al. gelang es mit murinen MSC mit den verschiedensten Trägermaterialien ektope Knochenbildung auszulösen. Die klinisch relevante Überprüfung erfolgreicher Knochenneubildung durch humane MSC in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien erfordert eine subkutane Implantation in

## 1. Einleitung

immuninkompetente Mäuse (Kuznetsov et al. 1997, Muraglia et al. 1998, Gronthos et al. 2000, Janicki et al. 2010). Als Wirtstiere kamen immuninkompetente Nude oder SCID Mäuse (engl., severe combined immunodeficiency) in Frage, die eine Implantation der xenogenen, humanen Zellen auf Biomaterialien bei geringer Abstoßungsreaktionen ermöglichen. Grundsätzlich ist das ektope Modell eine anerkannte, kosteneffektive Methode, um das Verhalten transplantierter MSC in der Umgebung eines lebenden Organismus zu untersuchen (Kasten et al. 2006). Die als Wirt dienenden Tiere liefern die für die Implantate notwendige Vaskularisierung und Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz zur orthotopen Transplantation fehlen beeinflussende Faktoren des Zielgewebes (Wachstumsfaktoren, Osteoprogenitorzellen), die Einfluss auf die Leistungen der zu vergleichenden Biomaterialien haben könnten (Krebsbach et al. 1997, Muraglia et al. 1998, Kuznetsov et al. 2000, Gronthos et al. 2003, Kasten et al. 2004, 2006).

### 1.9.2. Einfluss von Form und Partikelgröße

Biologische Knochenersatzmaterialien besitzen eine größere innere Oberfläche als synthetisches  $\beta$ -TCP, in ihrer Morphologie ähneln sie dem menschlichen Knochen, so können sie in das umliegende Knochengewebe integriert werden. Die Kombination aus großer innerer Oberfläche und interkonnektierendem Porensystem erhöht die Aufnahmekapazität für Blut, Proteine und Wachstumsfaktoren, zusätzlich wird ein optimales Einwachsen von neuem Knochengewebe und Blutgefäßen ermöglicht. Aus diesem Grund könnten biologische Knochenersatzstoffe synthetischen überlegen sein. Bislang wurden in unserer Gruppe synthetische Knochenersatzstoffe im ektopen Tiermodell vergleichend darauf untersucht, ob sie die Knochenbildung expandierter humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarksaspiraten induzieren können. Dabei wurden reine  $\beta$ -TCP- und kombinierte  $\beta$ -TCP-Hydroxylapatit-Keramiken in verschiedenen Partikelgrößen und -formen (Granulate, Blöcke) verglichen (Kasten et al. 2008). Sowohl mit reinen  $\beta$ -TCP als auch mit kombinierten  $\beta$ -TCP-Hydroxylapatit-Granulaten konnte neues Knochengewebe gefunden werden. Die

## 1. Einleitung

besten Ergebnisse erzielte die reine  $\beta$ -TCP-Gruppe mit Granulaten einer Partikelgröße von 0,4-0,7 mm (Janicki et al 2010). Zu große Partikel verhindern das Einwachsen von neuen Blutgefäßen, kleinere Partikel ermöglichen eine frühzeitige Vaskularisierung des Knochendefektes und damit verbunden auch die Knochenregeneration. In den meisten Studien mit  $\beta$ -TCP oder HA-TCP-Keramiken (Haynesworth et al. 1992, Kasten et al. 2005, Siddappa et al. 2007, Agata et al. 2007, Janicki et al. 2010) gab es allerdings eine Ausfallrate von etwa 30% der MSC Proben die nicht in der Lage waren, im ektopen Mausmodell Knochen zu bilden (Janicki et al. 2010).

### 1.10. Fragestellung / Zielsetzung

Bislang ist kein Knochenersatzmaterial bekannt, das nachweislich humane MSC aller Spender in einem ektopen Modell ausnahmslos zur Knochenbildung anregt. In Anbetracht eingeschränkter Erfolge mit synthetischen Knochenersatzstoffen sollten nun biologische Knochenersatzstoffe hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft werden, MSC von geringerem osteogenen Potential, welches z.B. durch das Spenderalter oder die Wachstumseigenschaften der MSC bedingt sein kann, reproduzierbar zu möglichst starker Knochenbildung anzuregen.

Da der Zusatz von Kollagen zu synthetischem Hydroxylapatit die Porosität und die osteoinduktiven Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien verbesserte (Zou et al. 2004, Wahl et al. 2006), stellte sich darüberhinaus die Frage, ob ein natürlicher kollagen-haltiger Knochenersatzstoff kollagen-freien Präparaten von Tierknochen überlegen sein kann. Schließlich war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, ob mit natürlichen Knochenersatzstoffen equinen Ursprungs ähnlich gute Resultate erzielt werden wie mit solchen bovinen Ursprungs, um das minimale Restrisiko der Übertragung einer Prionenerkrankung beim Einsatz von Knochenersatzstoffen aus Rinderknochen zu vermeiden.

Der gewählte Ansatz umfasste MSC aus dem Knochenmark von 9 Spendern, die nach Isolierung und Expansion auf fünf unterschiedliche Trägermaterialien gesiedelt wurden. Nach subkutaner Implantation für 8 Wochen in SCID-Mäuse sollte die Knochenbildung histomorphometrisch beurteilt werden. Da sich MSC,

## 1. Einleitung

die das Kriterium der Multipotenz nicht erfüllen, nicht eignen würden, um Knochenersatzstoffe hinreichend zu beurteilen, sollten die eingesetzten MSC parallel zu den in vivo Studien in vitro charakterisiert werden. Als einfache und anerkannte Methode gilt der Nachweis ihrer in vitro Multidifferenzierungskapazität. Hierfür werden MSC durch unterschiedliche Medienzusammensetzung adipogen, chondrogen bzw. osteogen differenziert. Die aus dieser Arbeit resultierenden Daten sollten beweisen, dass die neu entwickelten biologischen Knochenersatzmaterialien im Rahmen des *Tissue Engineering* erfolgreich eingesetzt werden können, alle positiven Eigenschaften eines Knochenersatzmaterials vereinigen und die bisherigen Knochenersatzstoffe übertreffen.



## 2. Material & Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck KGA, Darmstadt
Alizarin Rot	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Aquatex	Merck KGA, Darmstadt
Bouin`s Fixierlösung	Sigma- Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma- Aldrich, Steinheim
CPC	Sigma- Aldrich, Steinheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Dexamethason	Sigma- Aldrich, Steinheim
Dextransulfat	Sigma- Aldrich, Steinheim
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMEM high Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM low Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix [5 mM]	Qiagen GmbH, Hilden
EDTA	Sigma- Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe
Eosin	Chroma GmbH & CO. KG, Münster
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
Fast Red Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FCS	Biochrom AG, Berlin

## 2. Material & Methoden

Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Hämalaun nach Mayer	Chroma GmbH & CO. KG, Münster
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Heringssperma DNA	Eppendorf, Hamburg
Hico-Mic	Hitz & Co. Köln
Insulin	Sanofi- Aventis, Frankfurt am Main
Insulin-Transferrin- Selenit (ITS)	Sigma- Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kernechtrot	Chroma GmbH & CO. KG, Münster
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma- Aldrich, Steinheim
Maleinsäure	Merck Schuchhardt OHG, Hohenbrunn
Mitomycin C	Sigma- Aldrich, Steinheim
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma- Aldrich, Steinheim
NBT/BCIP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ölrot O	Chroma GmbH & CO. KG, Münster
Paraffin	Leica Mikrosysteme GmbH, Nussloch
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Merck KGaA, Darmstadt
Prolin	Sigma- Aldrich, Steinheim
RNase-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen GmbH, Hilden
Streptavidin-Biotin-Komplex	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Tissucol DuoS (Fibrinogen/Thrombin)	Baxter Deutschland GmbH
Tris base	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma- Aldrich, Steinheim

## 2. Material & Methoden

Trypanblau	Sigma- Aldrich, Steinheim
Türksche Lösung	Sigma- Aldrich, Steinheim
XEM	Vogel GmbH, Gießen

### 2.1.2. Puffer und Lösungen

ALP-Puffer für Zelllysate	0.1 M Glycin, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM ZnCl <sub>2</sub> , pH 10.4
Blockierlösung für in situ-Hybridisierung	1 % Blocking reagent in DIG-1 Puffer
CPC (10%)	10 g/l CPC in 10 mM NaPO <sub>3</sub>
Denhardt's Lösung (100x)	20 g/l Ficoll 400, 20 g/l Polyvinylpyrrolidon, 20 g/l BSA
DIG-1-Puffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5
DIG-3-Puffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9.5
DIG-Waschpuffer	0.3 % Tween 20 in DIG-1 Puffer
FCS-Puffer	4 % FCS in PBS, pH 7.4
Hybridisierungspuffer	4x SSC, 1x Denhardt's Lösung, 5 % Dextransulfat, 50 % deionisiertes Formamid, 100 µg/ml Lachsspermien-DNA
PBS-Puffer	8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
PFA 4%	40 g/l PFA in PBS
SSC 20x	173.3 g/l NaCl, 88.2 g/l Na-Citrat, pH 7
Substratpuffer für Zelllysate	1 mg/ml p-NPP in ALP-Puffer I

## 2. Material & Methoden

TAE 50x	242 g/l Tris base, 57.1 g/l Eisessig, 100 m/l 0.5 M EDTA pH 8
TBS 10x	8.77 g/l NaCl, 6.07 g/l Tris

### 2.1.3. Zellkulturmedien

#### Expansionsmedien

Embryonales Stammzellmedium (ES)	DMEM 4.5 g/l Glucose, 11 g/l Pyruvat ohne Glutamin, 1 % L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 0.1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
----------------------------------	---

#### Induktionsmedien

Adipogenes Induktionsmedium	DMEM 4.5 g/l Glucose, 10 % FCS, 0.01 mg/ml Insulin, 1 $\mu$ M Dexamethason, 0.2 mM Indomethacin, 0.5 mM Isobutylmethylxanthin, 1% Penicillin/Streptomycin
Chondrogenes Induktionsmedium	DMEM 4.5 g/l Glucose, 1 % ITS, 1.25 mg/ml BSA, 0.35 mM Prolin, 0.1 $\mu$ M Dexamethason, 0.17 mM Ascorbinsäure, 1 mM Natriumpyruvat, 10 ng/ml TGF $\beta$ -3
Osteogenes Induktionsmedium	DMEM 4.5 g/l Glucose, 10 % FCS, 0.17 mM Ascorbinsäure, 0.1 $\mu$ M Dexamethason, 10 mM $\beta$ -Glycerophosphat

## 2. Material & Methoden

### 2.1.4. Enzyme und Wachstumsfaktoren

FGF 2	Active Bioscience GmbH, Hamburg
Hyaluronidase	Sigma- Aldrich, Steinheim
Kollagenase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pepsin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Pronase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K	Fermentas GmbH. St. Leon- Rot
Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TGF- $\beta$	Humanzyme, Chicago, USA
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin

### 2.1.5. Färbelösungen

Alizarin Rot S 0,5 %	5 g/l Alizarin Rot S in Aqua dest.
Ölrot O 0,5%	Stammlösung: 5 g/l Ölrot O in 99 % Isopropanol; Gebrauchslösung: 6 Vol. Stammlösung in 4 Vol. Aqua dest.

### 2.1.6. Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Maus anti-human Kollagen Typ II (Klon II-4C11)	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Ziege-Anti-Maus konjugiert	IgG, Biotin- Dianova GmbH, Hamburg

## 2. Material & Methoden

### 2.1.7. Kits

Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Vectastain® ABC-Alkalische Phosphatase KIT	Vector Laboratories, California, USA

### 2.1.8. Primer

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Produktgröße</u>
AluYb8-F	5'- CGA GGC GGG TGG ATC ATG AGG T - 3'	247 nt
Alu-R	5'- TTT TTT GAG ACG GAG TCT CGC - 3'	
SINE/B1-F	5'- GCC CGG CGG TGG TGG C -3'	143 nt
SINE/B1-R	5' - TGT TTT TCG AGA CAG GGT TTC - 3'	
SINE/B2-F	5'- GGG CTG GAG AGA TGG CTC - 3'	166 nt
SINE/B2-R	5'- TAT TTA TTA TAT GTG AGT ACA CTG- 3'	

### 2.1.9. Tierhaltungsmaterialien und OP-Bedarf

Chirurgisches Nahtmaterial, Prolene®	Ethicon Inc., Norderstedt
Einstreu, steril	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Einweg- Kanülen, steril	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Einweg- Spritzen, steril	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Filterhauben	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg

## 2. Material & Methoden

Gitterdeckel	Tecniplast	DE	GmbH, Hohenpeißenberg
Häuschen	Tecniplast	DE	GmbH, Hohenpeißenberg
Handschuhe, steril	Semperit	Ges.m.b.H.,	Vienna, Österreich
Inkubatoren	Tecniplast	DE	GmbH, Hohenpeißenberg
Makrolonkäfige	Tecniplast	DE	GmbH, Hohenpeißenberg
Nagerfutter, steril	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest		
Nestlets	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest		
OP-Besteck	Aesculap AG, Tuttlingen		
Trinkflasche mit Kappe	Tecniplast	DE	GmbH, Hohenpeißenberg
Vidisic <sup>®</sup> Augensalbe	Dr. Mann Pharma, Berlin		

### 2.1.10. Narkosemittel

Ketavet, Ketamin <sup>®</sup>	Pfizer GmbH, Berlin
Medetomidinhydrochlorid, Domitor <sup>®</sup>	Pfizer GmbH, Berlin
Atimpamezolhydrochlorid, Antisedan <sup>®</sup>	Pfizer GmbH, Berlin
NaCl	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

## 2. Material & Methoden

### 2.1.11. Knochenersatzmaterialien

β-TCP (Cyclos <sup>®</sup> ); Porosität 60% aus Makroporen	Robert Mathys Stiftung, Bettlach, Schweiz
bovines Hydroxylapatit (bHA), (Bio-Oss <sup>®</sup> ); Porosität 75-80% aus Nano- und Mikroporen	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
bovines Hydroxylapatit-Kollagen (bHA-C), (Tutobone <sup>®</sup> ); Porosität 50-70% aus Makroporen	Tutogen Medical Research
equines Hydroxylapatit-Kollagen (eHA-C); Porosität 75-80% aus Nano- und Mikroporen	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
equines Hydroxylapatit (eHA); Porosität 75-80% aus Nano- und Mikroporen	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz

### 2.1.12. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einweg- Skalpelle	Feather Safety Razor Co., LTD, Japan
Handschuhe (Latex)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Handschuhe (Nitril)	Ansell LTD, Red Bank, USA
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Polypropylenmembranen	NeoLab GmbH, Heidelberg
Polypropylenröhrchen	Packard Bioscience, Niederlande
Reaktionsgefäße bis 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml	BD Biosciences GmbH, Heidelberg



## 2. Material & Methoden

Reaktionsgefäße 50 ml	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Seidenfaden	SMI AG, Hünningen, Belgien
Serologische Pipette	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Sieb Maschenweite 250 µm und 800 µm	Retsch GmbH, Haan
Super Frost Ultra Plus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one GmbH, Essen

### 2.1.13. Geräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
AxioCam HRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Heizblock	UniEquip GmbH, Planegg
LEP Mac5000	Ludl Electronoc, Hawthorne
MACSI MAG Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Magnete/ Ständer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axioplan2 Imaging	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
PCR Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
pH Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Schlittenmikrotom Jung Histoslide	Leica Microsystems GmbH, Nussloch

## 2. Material & Methoden

Sterilbank Thermo Electron	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tecan Sunrise Elisa Reader	Tecan Austria GmbH, Gröding, Österreich
Vortex	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellinkubator Thermo Electron	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	MS-L GmbH, Dielheim

### 2.1.14. Computer-Software

Adobe Photoshop 7.0.1, © 2006-2008, Adobe Systems Incorporated

AxioVision Rel. 4.6.3.0, © 2006-2008, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH

ImageJ 1.42q, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA

Microsoft Office Excel 2003, © 1985-2003, Microsoft Corporation

Microsoft Office PowerPoint 2003, © 1987-2003, Microsoft Corporation

Microsoft Office Word 2003, © 1997-2004, Microsoft Corporation

SPSS 16.0 for Windows®, © 1989-2007, SPSS Inc., USA

## 2.2. Gewinnung von Knochenmark

Während Routineeingriffen, wobei es sich meist um Total-Endoprothese (TEP)-Operationen des Hüftgelenks handelte, wurde durch Chirurgen der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg mittels Femuraspiration Knochenmark (10-20 ml) entnommen. Das Aspirat wurde umgehend nach Entnahme aufgearbeitet. Vor dem Eingriff wurden die Patienten durch die Chirurgen aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich bestätigt. Für die Studie wurde Knochenmark von 9 Patienten verwendet.

## 2. Material & Methoden

### 2.3. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Unter Verwendung von Trypan Blau-Färbelösung wurden vitale Zellen im Zellmedium ausgezählt, in frisch isolierten Knochenmarkaspiraten wurde die Zellzahl nach Lyse enthaltener Erythrozyten durch Türk'sche Färbelösung ermittelt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in 16 Quadraten (je 4 Quadrate pro Quadrant) ausgezählt, das Ergebnis durch 4 geteilt um einen Mittelwert zu erhalten, dieser wurde mit dem eingesetzten Volumen der Zellsuspension, dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor multipliziert um die Zellzahl pro Volumeneinheit zu erhalten:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl}_{4 \text{ Großquadrate}}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor (1000)}$$

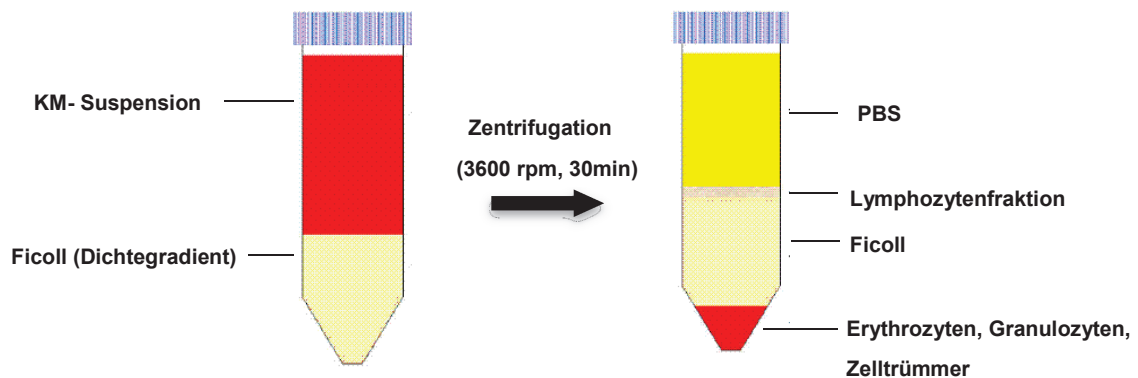
Abb. 4 Berechnung zur Ermittlung der Zellzahl/ml nach Auszählung mittels Neubauer Zählkammer in Zellsuspensionen

### 2.4. Isolierung mesenchymaler Stammzellen

Zur Isolierung mononuklärer Zellen aus humanen Knochenmarksaspiraten eignet sich die Dichtezentrifugation mit Saccharose-Epichlorhydrin (Ficoll™). Zunächst wurde das Knochenmarkaspirat unmittelbar nach Entnahme in ein 50 ml steriles Polypropylenröhrchen (FALCON) überführt und zur Reinigung und Fettentfernung 2x mit dem zweifachen Volumen Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) versetzt und jeweils 10 Minuten bei 1800 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in PBS resuspendiert und die Suspension im Verhältnis 1:1 – 1:2 vorsichtig als oberste Schicht auf 15 ml Ficoll™ pipettiert. Anschließende Zentrifugation (30 min bei 3600 rpm ohne Rotorbremse) bewirkte eine Schichtung der Zellen gemäß ihrer Dichte. Ficoll™ hat eine Dichte von 1,077 g/ml, so dass sich Monozyten und Lymphozyten in der

## 2. Material & Methoden

Interphase, als Schicht über Ficoll™ und unter dem Überstand, der aus Thrombozyten, Plasma und PBS besteht, anreicherten. Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer sedimentieren gemäß ihrer Dichte auf den Grund (Abb. 5). Die gewünschte lymphozytenreiche Interphase wurde abpipettiert, zur Entfernung zellschädigender Ficoll™-Reste mit PBS versetzt und erneut 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Sediment in PBS resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 µl für die Zellzählung entnommen, die Suspension anschließend erneut für 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer Zählkammer unter Verwendung von Türk'scher Lösung. Entsprechend der ermittelten Zellzahl wurde das erhaltene Zell-Sediment mit modifiziertem Expansionsmedium (ES-Medium) auf ein Volumen von 1 Millionen Zellen/ml eingestellt und in gelatinisierten Zellkulturflaschen in einer Dichte von 200000 Zellen/cm<sup>2</sup> in ES-Medium ausgelegt.



**Abb. 5 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von MSC.** Ficoll™ wurde mit Knochenmarksuspension überschichtet und ohne Bremsfunktion 30 Minuten bei 3600 rpm zentrifugiert. Die erwünschte Mononuklearen-reiche Schicht befindet sich in der Interphase direkt oberhalb des Dichtgradienten. Partikel mit höherer Dichte sedimentieren an den Grund des Röhrchens.

## 2. Material & Methoden

### 2.5. Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

MSC wurden in gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Beschichtung wurde 0,1%ige Gelatine in PBS in die Zellkulturflaschen pipettiert. Zur Polymerisierung wurden die Flaschen für 30 Minuten bei 37°C liegend gelagert. PBS wurde abgenommen und umgehend Kulturmedium hinzu pipettiert, um ein Austrocknen der Gelatineschicht zu verhindern. Frisch aus Knochenmarkaspirat isolierte MSC wurden in einer Dichte von  $1,25 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in gelatinebeschichtete Flaschen in ES-Medium ausgesät (Passage 0) und unter Standardbedingungen bei einem Kohlendioxidgehalt von 5%, Luftfeuchtigkeit von 95% und physiologischem Sauerstoffpartialdruck im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und nach Spülen der Zellen mit PBS durch neues Medium ersetzt. Da die gewünschten humanen mesenchymalen Stammzellen adhärent wachsen, konnten sie durch Austausch des Kulturmediums von nicht-adhärenenten, hämatopoetischen Stammzellen getrennt werden. Erreichten adhärente Zellen eine Konfluenz von 80-90% wurden sie in neuen gelatinisierten Kulturflaschen subkultiviert. Dafür wurde das alte Medium abgenommen, die Flaschen 2x mit PBS gewaschen und dann mit vorgewärmtem 1% Trypsin/EDTA versetzt. Nach 5 Minuten bei 37° C im Brutschrank wurden die Zellen durch Trypsin enzymatisch vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Unter dem Mikroskop wurde die Enzymwirkung kontrolliert, gegebenenfalls wurden durch vorsichtiges aber sorgfältiges Klopfen gegen die Kulturflasche noch adhärente Zellen gelöst. Durch Zugabe des aufgefangenen Mediums wurde die Wirkung des Enzyms gestoppt, die Zellsuspension zentrifugiert und MSC in einer Aussaatdichte von  $3,5-5 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> in ES-Medium subkultiviert (Passage 1). Für alle weiteren Versuche wurden MSC aus Passage 2 verwendet.

## 2. Material & Methoden

### 2.6. Nachweis der Multipotenz von MSC in vitro

Als einfache und repräsentative Methode zur Charakterisierung der in dieser Studie eingesetzten MSC wurden, parallel zu den in vivo Studien der ektopen Knochenbildungsfähigkeit, in vitro Studien durchgeführt, um die Multipotenz nachzuweisen. Hierfür wurde ein Teil der Spender-MSC durch Variationen der Medienzusammensetzung in adipogene, chondrogene bzw. osteogene Richtung differenziert. Adhärenzte Zellen in Passage 2 wurden enzymatisch von den Kulturflaschen gelöst und wie im Folgenden beschrieben kultiviert.

#### 2.6.1. Osteogene in vitro Differenzierung von MSC

Zur Induktion der Osteogenese wurden MSC von 6 Spendern in osteogenem Medium (Kasten et al., 2005) kultiviert. Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason wurden dem Medium zugesetzt, um eine Differenzierung in Knochengewebe hervorzurufen. Von jedem der 6 Spender wurden MSC auf vier 24-Loch-Kulturplatten in einer Dichte von 35000 Zellen in 4 Plattenvertiefungen in 500  $\mu$ l Medium ausgelegt. Der Verlauf der osteogenen Differenzierung wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten, an Tag 1, 7, 14 und 21 der Kultivierung, durch Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (ALP)-Aktivität bzw. der Messung des Mineralisierungsgrades der extrazellulären Matrix, jeweils in Doppelstimmung, untersucht (s. Abb. 6).

Außerdem wurde zur Normierung der Werte zu jedem der angegebenen Zeitpunkte die Gesamtproteinmenge in jedem Loch bestimmt.

## 2. Material & Methoden



**Abb. 6 Schematische Darstellung einer 24-Loch-Kulturplatte zum Nachweis der Multipotenz humaner MSC in vitro.** Um die osteogene Differenzierungsfähigkeit humaner MSC zu untersuchen, wurden pro Spender (n=6) in 24-Loch-Platten in vier Vertiefungen jeweils 35000 Zellen ausgelegt. Um den Zeitverlauf der Osteogenese zu beurteilen, wurden pro Spender 4 Platten angelegt und nach 1, 7, 14 bzw. 21 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium jeweils in Doppelbestimmung die ALP-Aktivität (rot gefärbt) und Mineralisierung (blau gefärbt) bestimmt. Quelle: [http://www.coldspring.com.cn/Images/CD\\_24.JPG](http://www.coldspring.com.cn/Images/CD_24.JPG), modifiziert

### 2.6.1.1. Beurteilung des Mineralisierungsgrades in vitro osteogen differenzierter MSC

Nach 1, 7, 14 bzw. 21 Tagen wurden osteogen differenzierte MSC von 6 Spendern auf die Ablagerung einer calciumreichen extrazellulären Matrix untersucht. Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, 20 min bei 4°C in 70% Ethanol fixiert, 4x mit Aqua dest. gespült und mit 0,5% Alizarinrot S-Lösung gefärbt (Stenderup et al. 2003). Alizarinrot reagiert mit Kalzium unter Chelatbildung. Nach der Färbung wird der Zellrasen 4x mit Aqua dest. gespült und zur Herauslösung des gefärbten Calciums 20 min in Cetylpyridiniumchlorid (CPC) inkubiert. Die Intensität der Färbung stellte sich proportional der gebundenen Calciummenge dar und wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Standardgerade wurde anhand einer Verdünnungsreihe von Alizarinrot in 10% CPC erstellt. Die errechneten Werte wurden auf die Gesamtproteinmenge normiert (s. Abschnitt 2.6.1.3.)

## 2. Material & Methoden

### **2.6.1.2. Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach osteogener in vitro Differenzierung**

Die Alkalischen Phosphatase (ALP) ist ein Enzym, das in Knochen und Leber vorkommt, der Nachweis ihrer Aktivierung in Zelllysaten ist daher ein gängiger Marker für enthaltene Osteozyten. Osteogen differenzierte MSC von 6 Spendern wurden an Tagen 1, 7, 14 und 21 der Kultivierung für 10 min bei 4°C in 1% Triton X- 100 lysiert, die Lysate bis zur Messung nach Ende der gesamten Differenzierungszeit bei -80°C gelagert. Pro Zeitpunkt wurden 100 µl der aufgetauten Lysate mit 100 µl Substrat-Puffer im Doppelansatz in einer 96-Loch-Flachbodenplatte für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch ALP wird p-Nitrophosphat (p-NPP) zu p-Nitrophenol (p-NP) und Phosphat hydrolysiert. Mittels ELISA-Reader lässt sich der dadurch auftretende Farbumschlag bei 405/490 nm messen. Die Standardgerade wurde durch Verdünnung von p-NP in Zwischenschritten mit einer Anfangskonzentration von 50 µg/ml angefertigt. Die p-NPP Umsetzung wurde berechnet und auf die Gesamtproteinmenge im Zelllysat normiert (siehe Abschnitt 2.6.1.3.).

### **2.6.1.3. Messung der Gesamtproteinmengen aus Zelllysaten**

Um eine quantitative Aussage über die ALP-Aktivierung und den Grad der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (siehe Abschnitt 2.9.2 und 2.9.3.) treffen zu können, wurden die Ergebnisse auf den Gesamtproteingehalt im Loch normiert. Dieser wurde mit Hilfe eines 'Micro BCA Protein Assay Reagent Kits' bestimmt. In einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 15 µl Lysat (s. Abschnitt 2.6.1.2., Lysate der ALP-Messung wurden auch hier verwendet) mit 135 µl 1% Triton-X-100 vermischt, mit 150 µl einer frisch hergestellten ALP-Gebrauchslösung für 2 h bei 37°C inkubiert und die Absorption mittels ELISA-Reader bei 570 nm gemessen. Zweiwertige Kupfer-Ionen werden im alkalischen Milieu durch Proteine zu einwertigen Kupfer-Ionen reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure einen Komplex, dessen Menge linear zur Proteinmenge ansteigt (Smith et al. 1985).



## 2. Material & Methoden

Mit Hilfe einer BSA-Standardkurve wurde die Menge der Proteine für jedes Zelllysats bestimmt.

### 2.6.2. Adipogene in vitro Differenzierung von MSC

Von 3 Spendern wurden MSC in einer Dichte von 35000 Zellen im Doppelansatz in 500 µl insulinhaltigem, adipogenem Medium (Winter et al. 2003) in 24-Loch-Platten ausgelegt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 2-maligem Mediumswechsel pro Woche. Nach 14 Tagen wurden die Zellen zur qualitativen Analyse fixiert und gefärbt und zur Bewertung der adipogenen Differenzierungsfähigkeit die Entstehung lipidhaltiger Vakuolen beurteilt. Der Zellrasen wurde zunächst mit PBS gespült, für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert und 5 Minuten in 60% Isopropanol inkubiert. Die Färbung erfolgte für 15 Minuten bei RT mit Ölrot O (0,5%). Anschließend wurden die Proben kurz in 60% Isopropanol inkubiert und mit Aqua dest. gewaschen (Winter et al. 2003). Die qualitative Auswertung wurde visuell unter dem Mikroskop beurteilt und zur Dokumentation fotografiert.

### 2.6.3. Chondrogene in vitro Differenzierung von MSC

MSC von 6 Spendern wurden in Form von dreidimensionalen Sphäroiden (Dickhut et al. 2009) in chondrogenem Medium kultiviert. Von jedem Spender wurden 5 Sphäroide aus je  $5 \times 10^5$  Zellen angefertigt: Je 0,5 ml der Zellsuspension (Konzentration:  $1 \times 10^6$ /ml) wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und zur Sedimentierung 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 500 µl chondrogenes Medium ersetzt. Durch die Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor-β (TGF-β) sollen sich undifferenzierte MSC in Kollagen Typ 2 und Glucosaminoglycan produzierende Zellen entwickeln. Sobald der Mediumverbrauch durch die Zellen zurückging, wurden die Sphäroide aus den

## 2. Material & Methoden

Eppendorfgefäßen in 96-Loch-Mikrotiterplatten umgesetzt und mit jeweils 200 µl Medium versorgt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank bei regelmäßigem Mediumwechsel im Abstand von 2 Tagen. Pro Spender wurden 5 Sphäroide angesetzt. Nach 6 Wochen Inkubationszeit wurden sie zur qualitativen histologischen Auswertung aufgearbeitet.

### 2.7. In vivo Studie der Ektopen Knochenbildung

Mit Hilfe von Fibrinkleber wurden aus den Knochenersatzmaterialien (bHA, bHA-C, eHA, eHA-C und  $\beta$ -TCP) dreidimensionale Knochenersatzmaterial/MSC-Konstrukte hergestellt und für 8 Wochen subkutan in SCID-Mäuse implantiert.

#### 2.7.1. Vorbehandlung der Knochenersatzmaterialien

eHA-C und eHA lagen in Blöcken vor und wurden zunächst auf die einheitliche Partikelgröße von 0,25-1 mm/cm<sup>2</sup> gebracht. Unter sterilen Bedingungen wurden die Blöcke mittels Skalpell in kleinere Stücke geschnitten und konnten dann durch zwei Siebe (800 und 250 µm Maschenweite) auf die gewünschte Korngröße getrennt werden.  $\beta$ -TCP, bHA-C und bHA lagen bereits als Granulat vor. Die Materialien wurden während des Herstellungsprozesses sterilisiert und konnten unter sterilen Bedingungen auf 10 mg in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße eingewogen werden.

$\beta$ -TCP Granulate wurden unsteril abgewogen und anschließend bei 120°C im Trockenschrank für 6h sterilisiert, ohne Materialschädigungen zu riskieren.

#### 2.7.2. Herstellung der zellbesiedelten Knochenersatzstoffkonstrukte

Zu Beginn wurden alle Knochenersatzstoffe (je 10 mg in Eppendorfgefäßen) in steriler Kochsalzlösung (NaCl) für mindestens 30 Minuten, bzw. entsprechend der Vorbereitungszeit der MSC, rehydriert. MSC wurden bei einer Konfluenz von 80-

## 2. Material & Methoden

90% in Passage 2 mit Trypsin enzymatisch von der Kulturflasche gelöst. Durch Zugabe des alten Nährmediums wurde die Enzymwirkung gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (10 min bei 1000 rpm). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. 10 µl der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau verdünnt, wiederum 10 µl der Verdünnung in die Zählkammer pipettiert. Nur abgestorbene Zellen nahmen den Farbstoff auf und wurden blau gefärbt. Farblose, vitale Zellen konnten so differenziert und gezählt werden. Im Anschluss an die Zentrifugation konnte das entstandene Sediment nach Überstandabnahme entsprechend der Zellzählung mit PBS auf eine Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  vitalen Zellen/ml eingestellt werden.

NaCl wurde von den Knochenersatzmaterialien abgenommen und die Granulate mit 1 ml Zellsuspension versetzt (entspricht  $1 \times 10^6$  Zellen/10 mg Granulat). Für eine homogene Verteilung der Zellen wurde die MSC/Ersatzstoff-Suspension vorsichtig geschwenkt und im Anschluss zentrifugiert (10 min bei 1000 rpm). Die Zellen befanden sich nun auf und unterhalb der Knochenersatzmaterialien. Nun wurde der zellfreie Überstand abgenommen. Zur Formung dreidimensionaler Sphäroide wurden zunächst je 10 µl Thrombin resuspendiert und dann umgehend jeweils 10 µl Fibrinogen hinzu pipettiert. Durch sorgfältiges Mischen des Fibrinklebers mit dem MSC/Knochenersatzmaterial-Gemisch wurde eine homogene Verteilung der MSC im gesamten Konstrukt erreicht. Fibrinogen polymerisierte zu Fibrin, sodass innerhalb von 5 Minuten ein stabiles Sphäroid entstand. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die entstandenen Konstrukte bis zur Operation in ES-Medium aufbewahrt. Die Implantation erfolgte spätestens 1 Stunde nach Herstellung. Je 2 Konstrukte wurden auf diese Weise von MSC eines jeden Spenders pro Untersuchungsgruppe hergestellt.

### 2.7.3. Tierexperimentelle Arbeiten

Alle Operationen wurden durch die verantwortliche Regierungsbehörde Karlsruhe unter dem Aktenzeichen (G71/11) genehmigt und fanden im Versuchstierhaus der Orthopädischen Uniklinik in Heidelberg statt. Für die Studie wurden 29 weibliche, immundefiziente Mäuse (SCID, Severe Combined Immunodeficiency) des

## 2. Material & Methoden

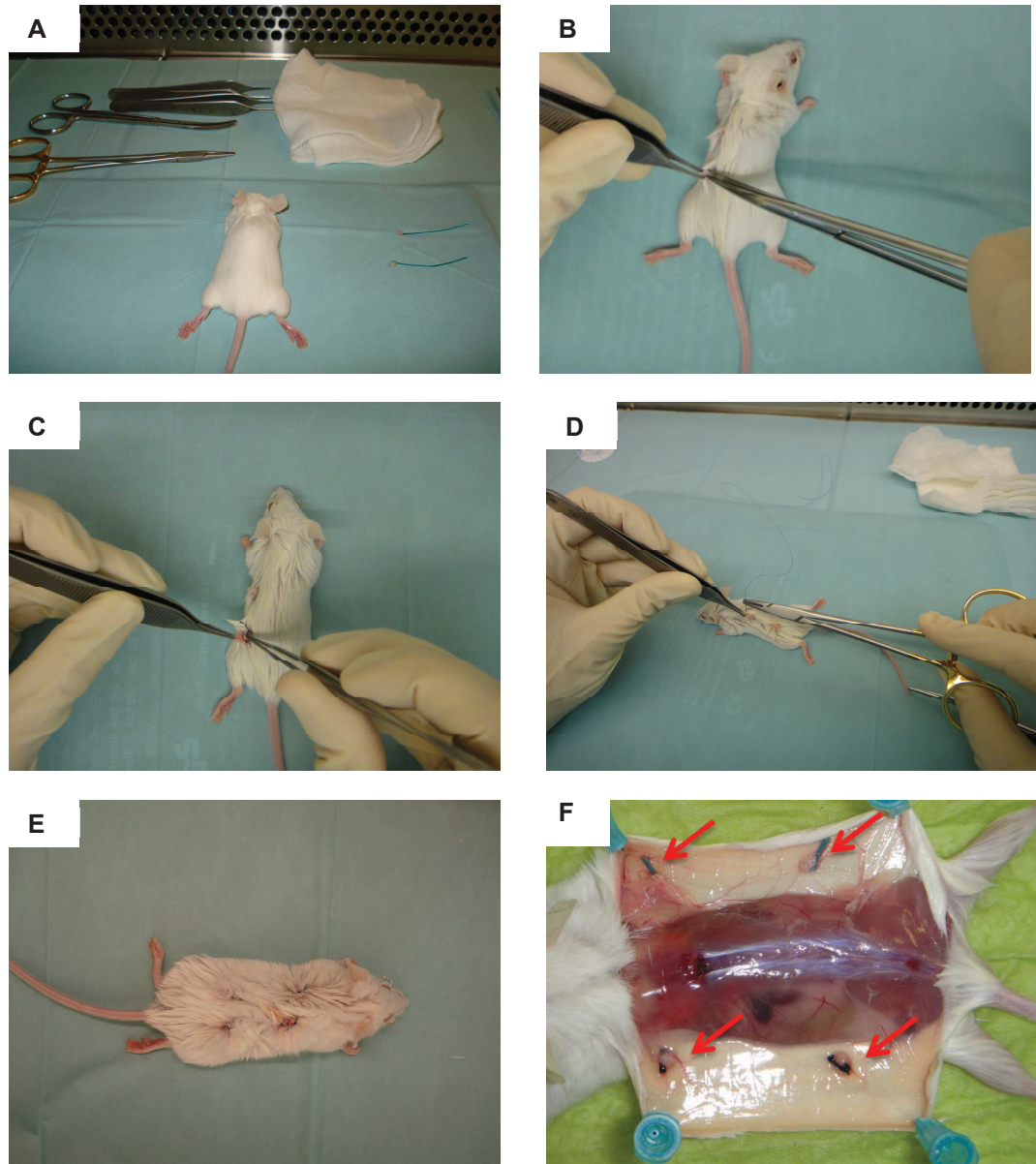
Stammes CB17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup>/crl im Alter von 6-8 Wochen eingesetzt. SCID-Mäusen fehlt aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation im Icr-Prkdc<sup>scid</sup> Gen eine ausreichende Lymphozytenreifung. Der resultierende Mangel an Lymphozyten führt dazu, dass sämtliche durch T- und B-Zellen vermittelte Immunreaktionen ausgeschaltet sind (Bosma et al. 1983). Aufgrund dieser stark reduzierten Immunreaktion wurde dieser Mausstamm für die Xenotransplantation gewählt. Die Tiere stammten ausschließlich von Charles River und wurden über die interdisziplinäre Biologische Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg bezogen. In autoklavierten Makrolonkäfigen (Typ 2) mit Filterhaube wurden 2-5 Tiere in steriler Einstreu gehalten. Die Mäuse bekamen autoklaviertes, pelletiertes Futter und steril-filtriertes Wasser ad libitum. Einmal wöchentlich wurden sie in frische Käfige mit frischem Futter und Wasser umgesetzt. Die Tierhaltung erfolgte bei 22 °C und einem Druck von 75 pa steril in Inkubatoren.

### 2.7.3.1. Transplantation der Knochenersatzmaterial/MSC-Konstrukte

Die Konstrukte aus MSC und Biomaterialien wurden innerhalb einer Stunde nach Herstellung subkutan in SCID-Mäuse implantiert. Alle nachfolgenden Eingriffe fanden unter sterilen Bedingungen in einer ausschließlich für die Maus-Operationen vorgesehenen Sterilbank in den Tieroperationsräumen der orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg statt. Um die Tiere in Vollnarkose zu versetzen wurde ihnen eine teilantagonisierbare Kombinationsnarkose aus 120 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketavet®) und 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Domitor®) in NaCl verabreicht. Die Tiere wurden gewogen und mit 17 µl/kg KG der Kombinationsnarkose intraperitoneal narkotisiert; zum Zeitpunkt der Operation lag das durchschnittliche Körpergewicht bei 20 g. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit Augensalbe bedeckt. Bei nicht mehr nachweisbaren Zwischenzehen- und Drohreflexen wurde die Operationsstelle zunächst desinfiziert und dorsal ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt gesetzt. Daraus wurden stumpf maximal 4 subkutane Taschen pro Tier präpariert. Pro Tasche wurde ein Konstrukt implantiert und diese mit einem nicht-resorbierbaren, monofilen Faden (Prolene®) mit Einzelknopfnähten verschlossen.

## 2. Material & Methoden

Um das Auftreten möglicher Wechselwirkungen zu reduzieren wurden ausschließlich Materialien derselben Herkunft in ein Tier transplantiert (equine bzw. bovine Materialien oder synthetisches  $\beta$ -TCP) (Abb. 7 A-E).



**Abb.7. Subkutane Transplantation von MSC/Knochenersatzmaterial- oder zellfreien Konstrukten, repräsentative Bilder:** (A) Die Operationen fanden stets unter sterilen Bedingungen statt; (B) Präparation subkutaner Taschen, maximal 4 pro Tier; (C) In jede Tasche wurde ein Konstrukt transplantiert, nur equine bzw. bovine oder synthetische Konstrukte wurden zusammen in ein Tier implantiert; (D) Nach der Transplantation wurden die Taschen vernäht; (E) Verteilung der Taschen so dass die Tiere nicht beeinträchtigt wurden; (F) Nach 8 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Konstrukte explantiert

## 2. Material & Methoden

Zur Kreislaufunterstützung und zum Schutz vor Dehydrierung wurden den Mäusen im Anschluss an die Transplantation 100 µl pro 10 g Körpergewicht Natriumchlorid s.c. in die Nackenfalte gespritzt. Zur späteren Identifizierung wurden die Mäuse durch Ohrlöcher markiert.

Nach einer Stunde wurde die Narkose mit Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®) 2,5 mg/kg KG in NaCl subkutan in eine Rückenhautfalte antagonisiert.

### **2.7.3.2. Explantation der Konstrukte**

Acht Wochen nach der Operation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert. Die Haut wurde mit einem Skalpell eröffnet und die Konstrukte wurden explantiert (Abb. 7F).

## **2.8. Histologische Untersuchungen**

### **2.8.1. Fixierung und Einbettung der explantierten Knochenersatzstoff/MSC-Konstrukte**

Nach Explantation der Knochenersatzstoff/MSC-Konstrukte wurden diese umgehend für 48 Stunden in Bouinscher Lösung fixiert und dabei partiell dekalzifiziert, anschließend viermal in Aqua dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (70%, 96%, 100%) je 24 h entwässert. Nach dreistündiger Inkubation in Aceton wurden die Konstrukte zunächst vier Stunden in flüssiges Paraffin gebracht.

### **2.8.2. Fixierung und Einbettung in vitro chondrogen differenzierter MSC**

Nach 6 Wochen Differenzierung in chondrogenem Medium wurden die zu dreidimensionalen Sphäroiden geformten MSC zunächst 2 h in 4% PFA fixiert, in



## 2. Material & Methoden

aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Isopropanol je 2 h) entwässert, für je 2 Stunden in Aceton und flüssigem Paraffin inkubiert und schließlich in Paraffin eingebettet.

### 2.8.3. Herstellen der Paraffinschnitte

Alle Blöcke wurden am Schlittenmikrotom (Jung Histoslide, Leica Microsysteme GmbH) in 5 µm dünne Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden im Wasserbad bei 45°C gestreckt und aus dem Wasserbad heraus auf Objektträger aufgezoogen. Anschließend wurden diese für 24 Stunden im Brutschrank getrocknet. Zur Bewertung der ektopen Knochenbildung im dreidimensionalen Konstrukt wurden auf diese Weise von Paraffinblöcken in vivo kultivierter Knochenersatzmaterial/MSK- Konstrukte aus 3 Ebenen (Abstand je 50 µm) 16 Folgeschnitte (2 pro Objektträger) angefertigt. Von Paraffinblöcken chondrogen differenzierter MSC-Sphäroide wurden 8 Folgeschnitte (2 pro Objektträger) aus nur einer Ebene angefertigt.

### 2.8.4. Haematoxylin/Eosin-Färbung

Zur Untersuchung der ektopen Knochenbildung in MSC/Knochenersatzstoff-Konstrukten nach 8 Wochen in vivo Kultivierung wurden pro Konstrukt und Ebene (n=3) 2 Schnitte mit Haematoxylin-Eosin (H&E) gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte in XEM entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50% Isopropanol) je 5 min fixiert und 2x 3 min in Aqua dest. gewaschen. Die Zellkerne wurden für 8 Minuten in Hämalun (sauer) nach Mayer gefärbt, die Schnitte in Leitungswasser gewaschen, für 20 Minuten in Leitungswasser gebläut (zur pH Wert- Erhöhung) und 3 min in Aqua dest. inkubiert. Im Anschluss folgte die Gegenfärbung mit 1% Eosin für 1 Minute und 2-maliges Waschen in Aqua dest. (Rotfärbung der Plasmaproteine). Die Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe (90%, 2x 100% Isopropanol) je 30 Sekunden fixiert, anschließend in XEM 4x 3 min entwässert und schließlich in Hico-Mix eingebettet.

### 2.8.5. Nachweis von Nukleinsäuren in Gewebeschnitten

Die In Situ-Hybridisierung ist eine standardisierte Methode zum Nachweis von Nukleinsäure in Gewebeschnitten. Eine aus einer Nukleinsäure bestehende in vitro markierte Sonde hybridisiert mit der nachzuweisenden komplementären Nukleinsäure in den Kernen der Zellen des Gewebeschnittes. Mit speziesspezifischen Sonden (murin oder human) wurde neu gebildetes Gewebe in ausgesuchten Schnitten von MSC/Knochenersatzmaterial- Konstrukten nach 8 wöchiger in vivo Kultivierung auf dessen Herkunft untersucht.

#### 2.8.5.1. Herstellung human-spezifischer Alu-Sonden

Zum Nachweis humaner Zellen in den explantierten Präparaten wurden die Gewebeschnitte mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden auf human-spezifische repetitive Alu-Sequenzen untersucht (Kasten et al. 2005). Die DIG-markierte Sonde wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Das PCR-Reaktionsgemisch wurde wie folgt angesetzt: 1x PCR-Puffer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 0.065 mM dTTP, 0.035 mM DIG-11-dUTP, 2 µl humane cDNA aus HeLa-Zellen, jeweils 10 pmol Vorwärts-Primer AluYb8-F und Rückwärts-Primer ALU-R, 5 Units Platinum Taq DNA- Polymerase und Aqua dest. ad 50 µl. Nach 3-minütiger Inkubation bei 94°C erfolgte die Synthese in 40 Reaktionszyklen: 15 sek bei 94°C und 1 min bei 61°C. Mit Hilfe eines 'QIAquick PCR Purification Kits' wurde das PCR-Produkt nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 50 µl gelöst und die Menge des Digoxigenin-Einbaus kontrolliert.



## 2. Material & Methoden

### 2.8.5.2. Herstellung Maus-spezifischer SINE B1- und SINE B2-Proben

Der Nachweis muriner Zellen erfolgte durch Untersuchung der Schnitte auf Maus-spezifische repetitive Sequenzen, sogenannte short interspersed nucleotide elements (SINE B1;SINE B2) (Steck et al. 2010). Zur Herstellung der DIG-markierten Sonden wurde folgender Ansatz pipettiert: 1x PCR-Puffer, 1.5mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM dATP, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 0.087 mM dTTP, 0.0125 mM DIG-11-dUTP, 50 ng genomische Maus-DNA, 5 U Platinum Taq Polymerase ad 50  $\mu$ l Aqua dest. Für die B1-Sonde wurden je 10 pmol SINE/B1-F und SINE/B1-R Primer verwendet, für die B2-Sonde 10 pmol SINE/B2-F und 10 pmol SINE/B2-R Primer. Nach 3-minütiger Inkubation bei 94 °C erfolgte die Reaktion in 40 Reaktionszyklen: 20 sek bei 94°C, 20 sek bei 60 °C und 40 sek bei 72 °C. Im Anschluss wurde die Sonde mittels 'QIAquick PCR Purification Kit' nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 50  $\mu$ l gelöst und die Menge des Digoxigenin-Einbaus kontrolliert.

### 2.8.5.3. In situ-Hybridisierung

Zum Nachweis der Herkunft des neu entstandenen Gewebes wurden von ausgewählten Paraffinblöcken mit in vivo kultivierten MSC/Knochenersatzstoff-Konstrukten unterschiedlicher Spender mittels Schlittenmikroton in 5  $\mu$ m dünne Schnitte hergestellt und auf Super Frost Objektträgern (2 Objektträger mit je 2 Schnitten pro Konstrukt) für 48 Stunden im Brutschrank getrocknet. Die Schnitte wurden 4x 4 min in XEM entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe jeweils 1 min rehydriert, 3 min mit 0.1% Tween/PBS gewaschen und 10 min bei 37 °C mit 50 ng/ml Proteinase K verdaut. Im Anschluss wurden sie 3 min in PBS gewaschen, mit 0.1 M Triethanolaminchlorid-Lösung (pH 8, in 0.25% Essigsäure) 10 min bei RT äquiliбриert und eine Stunde bei 42°C im Hybridisierungspuffer vorbehandelt. Der Hybridisierungspuffer wurde durch frischen Puffer inklusive 0.2 ng/ $\mu$ l Digoxigenin-markierter Sonde ersetzt. Die Schnitte wurden für 3 min bei 95°C auf dem Wärmeblock denaturiert und im Anschluss 3 min bei 4 °C auf einem Eisblock gekühlt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C für 16 Stunden in einer

## 2. Material & Methoden

feuchten Kammer, dann wurde 2x 5 min in 2x SSC bei RT und 2x 10 min in 0.1x SSC bei 42°C gewaschen. Im DIG 1-Puffer wurden die Schnitte 1 min bei RT äquiliibriert, unspezifische Bindungen 15 min lang in einer Blockierungslösung abgesättigt und das Gewebe eine Stunde bei RT mit Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase-konjugierten Fab- Fragmenten (1:500) inkubiert. Nachdem die Schnitte 2x 10 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen wurden, wurden sie 3 min im DIG 3-Puffer äquiliibriert. Die Visualisierung erfolgte mittels NBT/BCIP-Substrat (1:50) für 60 min bei RT. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt, die Proben in Aqua Tex eingebettet und zur qualitativen Auswertung fotografiert.

### 2.8.6. Immunhistologische Kollagen Typ 2-Färbung

Zur Bewertung der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit wurden die aus MSC von 6 Spendern hergestellten Sphäroide nach 6-wöchiger Inkubation in chondrogenem Medium für qualitative Untersuchungen bearbeitet (s. Abschnitt 2.8.3.). Die Proben wurden auf das Vorhandensein von Kollagen Typ 2 mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Kollagen Typ 2 kommt nur im Knorpel und Glaskörper des Auges vor und ist so charakteristisch zum Nachweis stattgefundenener Chondrogenese (Lüllmann-Rauch 2006). Zunächst wurden die Schnitte in XEM entparaffiniert, dann in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50% Isopropanol je 5 min) rehydriert, für 5 Minuten in Aqua bidest. und für 2 Minuten in PBS gewaschen. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer, die Waschschrirte in Färbegestellten durchgeführt. Zwischen folgenden Schritten wurde je 3x 2 min in PBS gewaschen: Die Schnitte wurden 15 min bei 37°C mit 4 mg/ml Hyaluronidase/PBS (pH 5.5) und 30 min mit 1 mg/ml Pronase/PBS (pH 7.4) bei 37°C verdaut. Bei 30-minütiger Inkubation in 5%-iger BSA/PBS-Lösung bei Raumtemperatur (RT) wurde die Antikörperreaktion blockiert. Im Anschluss folgte die Inkubation in Kollagen Typ 2-Primärantikörper (verdünnt in 1% BSA/PBS-Lösung 1:1000 (1 µg/ml)) über Nacht bei 4 °C (im Kühlschrank). Zwischen folgenden Schritten wurden die Schnitte nun 3x 5 min in Tris-gepufferter Saline (TBS) gewaschen: Der Sekundärantikörper, ein Biotin-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper, wurde 1:500 (2.4 µg/ml) in TBS verdünnt und die Schnitte damit

## 2. Material & Methoden

für 30 min bei RT inkubiert. Nach 30 Minuten in Alkalischer Phosphatase-Lösung (nach Herstellerangaben) wurde zur Visualisierung Fast Red (1 Tablette in 2 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,2 gelöst) auf die Schnitte pipettiert und die Proben für 10-15 min im Dunklen inkubiert. Dreimaliges Waschen mit Aqua dest. stoppte die Enzymreaktion. Die Kernfärbung erfolgte für 6 min mit Hämalaun nach Meyer mit anschließender Bläuung für 15 min in Leitungswasser. Die Schnitte wurden in AquaTex eingebettet.

### **2.8.7. Nachweis von Proteoglykanen mittels Safranin O – Färbung**

Um die chondrogene Differenzierungsfähigkeit humaner MSC zu beurteilen wurden Schnitte chondrogen differenzierter Sphäroide zum Nachweis von Proteoglykanen mit Safranin O gefärbt. Die Schnitte wurden 4x 5 min in XEM entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50% Isopropanol) je 5 min rehydriert und 2x 5 min in Aqua dest. gewaschen. Die Färbung der Proteoglykane in der Matrix entstandener Chondrozyten erfolgte für 10 Minuten mit Safranin O, dann wurde 3x mit Aqua dest. gewaschen und mit Fast Green Färbelösung für 15-20 Sekunden gegengefärbt. Die Proben wurden erneut 3x in Aqua dest. gespült, in aufsteigender Alkoholreihe (96%, 100%, 100% Isopropanol) je 20 sek ausdifferenziert, 4x 10 min in XEM entwässert und in Histo-Mic eingedeckelt.

### **2.8.8. Histomorphometrie**

Zur quantitativen Bewertung der ektopen Knochenbildung humaner MSC auf verschiedenen Knochersatzmaterialien wurden von jedem in vivo kultivierten Knochenersatzmaterial/MSC-Konstrukt 6 H&E-gefärbte Schnitte (s. Abschnitt 2.8.4.) unter dem Mikroskop fotografiert und als JPEG-Datei gespeichert. Die Bilder wurden zunächst mittels Adobe Photo Shop bearbeitet. Der neu entstandene Knochen wurde manuell umrandet und grau eingefärbt. In einer zweiten Ebene wurde das Gesamtkonstrukt eingezeichnet und schwarz gefärbt.

## 2. Material & Methoden

Beide Ebenen wurden auf die Hintergrundebene reduziert, sodass nun grau gefärbter, neu entstandener Knochen vom schwarzen Hintergrund zu differenzieren war. Die bearbeiteten Bilder wurden als TIFF-Datei in Graustufen gespeichert und mit ImageJ analysiert. Für die zu differenzierenden Farben wurden unterschiedliche Schwellenwerte gewählt und so die Gesamtfläche des Konstrukts und die Knochenfläche bemessen. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und der prozentuale Anteil des neu entstandenen Knochengewebes am Gesamtkonstrukt berechnet. Von jedem Konstrukt wurden 6 Schnitte beurteilt. Da für jedes Knochenersatzmaterial pro Spender zwei Konstrukte angefertigt wurden, konnten pro Spender und Material 12 Schnitte bewertet werden. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte des neuen Knochengewebes für jedes Knochenersatzmaterial ermittelt.

Zusätzlich sollte der Gesamtzellgehalt in mit oder ohne MSC implantierten Knochenersatzmaterial-Konstrukten verglichen werden. Hierfür wurden von jedem Knochenersatzmaterial H&E-gefärbte Schnitte von 4 verschiedenen Spender-MSC Konstrukten (KM 1105, KM 1112, KM 1113, KM 1126) sowie je 4 Schnitten der ohne MSC implantierten Knochenersatzmaterial-Konstrukte bewertet. Unter dem Lichtmikroskop wurden in zwei Sichtfeldern pro Schnitt alle Zellen ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

### **2.8.9. Statistische Auswertung der in vivo Studie**

Die errechneten Mittelwerte des neu entstandenen Knochengewebes (wie in Abschnitt 2.8.8. beschrieben) wurden für jedes Knochenersatzmaterial in Gruppen zusammengefasst. Alle Ergebnisse wurden mit der Software SPSS 16.0 für Windows 15.0 analysiert. Eine Varianzanalyse wurde mit einfaktorieller ANOVA durchgeführt (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Zur Korrektur des Signifikanzniveaus wurde der Bonferroni-Test verwendet.

### 2.9. Statistische Untersuchung, Korrelationen

Statistische Analyse zur Ermittlung linearer Zusammenhänge wurden mit Hilfe der Software SPSS 16.0 für Windows 15.0 durchgeführt. Mögliche Korrelationen zwischen der Alkalischen Phosphatase-Aktivität und dem Mineralisierungsgrad von osteogen differenzierten MSC von 6 Spendern (s. Abschnitt 2.6.1.) wurde mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten analysiert. Die Osteogenese-Marker wurden an vier Zeitpunkten der in vitro Kultivierung gemessen und erhaltene Werte auf mögliche Zusammenhänge untersucht.

Die ermittelten Werte der ALP-Aktivität sowie der Mineralisierungsgrad am Kultivierungstag 21 (n=6) wurden außerdem, mit Hilfe des Zusammenhangsmaßes nach Pearson, mit den Mittelwerten des neu entstandenen Knochengewebes aus der Histomorphometrie (s. Abschnitt 2.8.8.) auf Korrelationen untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung von Knochenersatzmaterialien

In der Studie wurden 4 biologische Knochenersatzmaterialien mit synthetischem  $\beta$ -TCP verglichen. Die Materialien unterschieden sich in Herkunft (bovin, equin, synthetisch), Zusammensetzung (kollagen-haltig, kollagen-frei) und Aufbau (Porosität, Porengröße) (Tab.1).

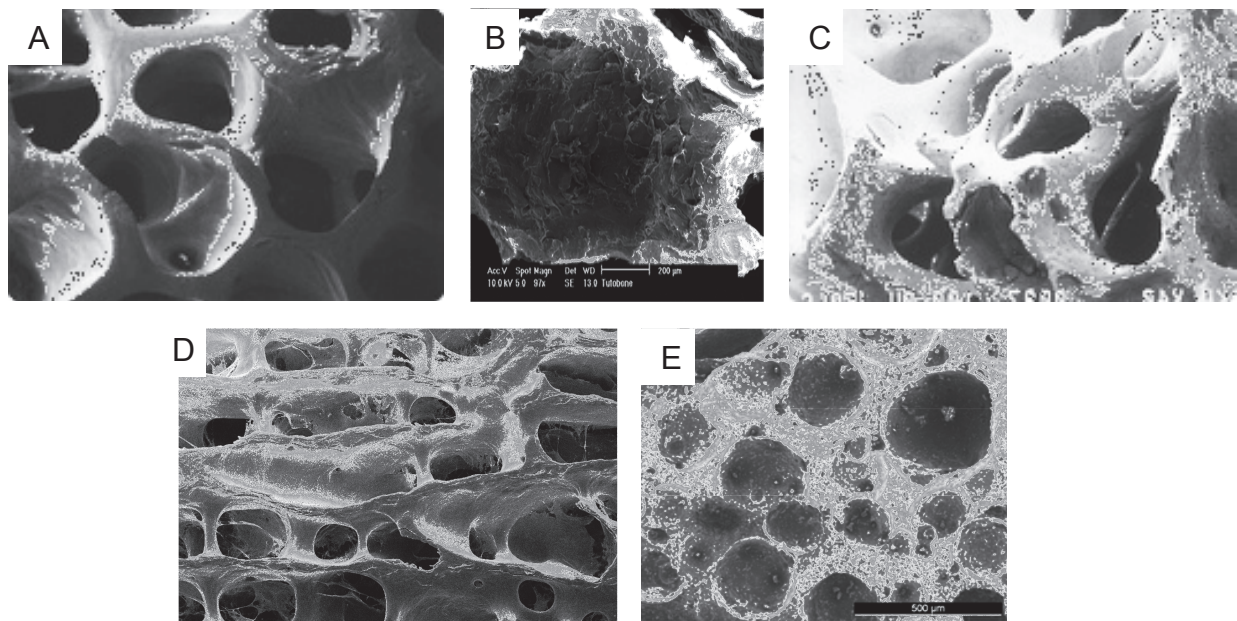
**Tab. 1 Zusammenfassung der Materialeigenschaften**

	<b>Porosität</b>	<b>Porengröße</b>	<b>Kollagen- gehalt</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Herkunft</b>
<b>bHA-C</b>	50-70%	Makroporen (150-600 $\mu\text{m}$ )	33%	Tutobone®	bovin
<b>bHA</b>	75-80%	Nano- (10-20nm) und Makroporen (100- 400 $\mu\text{m}$ )	0%	Bio-Oss®	bovin
<b>eHA-C</b>	75-80%	Nano- (10-20nm) und Makroporen (100- 400 $\mu\text{m}$ )	40%	In Entwicklung	equin
<b>eHA</b>	75-80%	Nano- (10-20nm) und Makroporen (100- 400 $\mu\text{m}$ )	0%	In Entwicklung	equin
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	60%	Makroporen (100-500 $\mu\text{m}$ )	0%	Cyclos®	synthetisch

In rasterelektronischen Aufnahmen der Knochenersatzmaterialien werden die strukturellen Ähnlichkeiten der biologischen Materialien zu menschlichem Knochen deutlich (Abb.8). Im Gegensatz zu  $\beta$ -TCP können diese Materialien durch eine große innere Oberfläche und interkonnektierendem Porensystem besser in natürliche Knochenumbau- und Knochenaufbauvorgänge integriert werden. Die hochporöse Struktur bietet den für die Knochenbildung notwendigen Raum für Osteogenese und Angiogenese.



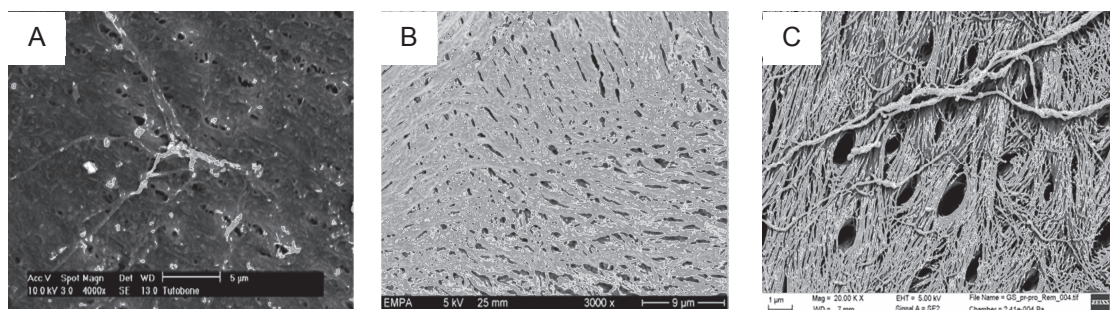
### 3. Ergebnisse



**Abb. 8 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen im Makroporenbereich** (A) humaner Knochen (50x), (B) bHA-C, (C) bHA (50x), (D) eHA-C (50x), (E)  $\beta$ -TCP.

Quelle: (A;B;C;D) Geistlich Pharma, (E) Janicki et al 2010

Durch den schonenden Herstellungsprozess von bHA, eHA und eHA-C werden auch Nanoporen nicht verschlossen. Das erhöht die Kapillarität und Hydrophilie des Materials. Bei bHA-C hingegen liegen keine Nanoporen mehr vor (Abb. 9). Aufgrund der ultrastrukturellen Ähnlichkeit zu bHA, sind von eHA keine Aufnahmen gezeigt.



**Abb. 9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen** (A) bHA-C (4000fach), (B) bHA (3000fach), (C) eHA-C (20000fach).

Quelle: Geistlich Pharma

### 3. Ergebnisse

#### 3.2. Charakterisierung humaner MSC in vitro

Zur Identifizierung von Stammzellen hat die Gewebs- und Mesenchymale-Stammzellkommission der „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) drei Hauptkriterien festgelegt: Mesenchymale Stammzellen müssen in der Lage sein an der Kunststoffoberfläche ihrer Kulturgefäße zu adhärieren, die Fähigkeit zur Expression spezifischer Oberflächenantigene besitzen und unter speziellen Kulturbedingungen zu Adipocyten, Osteozyten oder Chondrozyten differenzieren (Dominici et al. 2006). War die Zellausbeute expandierter MSC in Passage 2 ausreichend, wurden in vitro Versuche zum Nachweis der Multipotenz angesetzt. Von 6 der 9 Spender MSC Populationen konnte eine osteogene und chondrogene Differenzierung sowie für 3 der 9 Spender MSC Populationen eine adipogene Differenzierung korrekt durchgeführt werden.

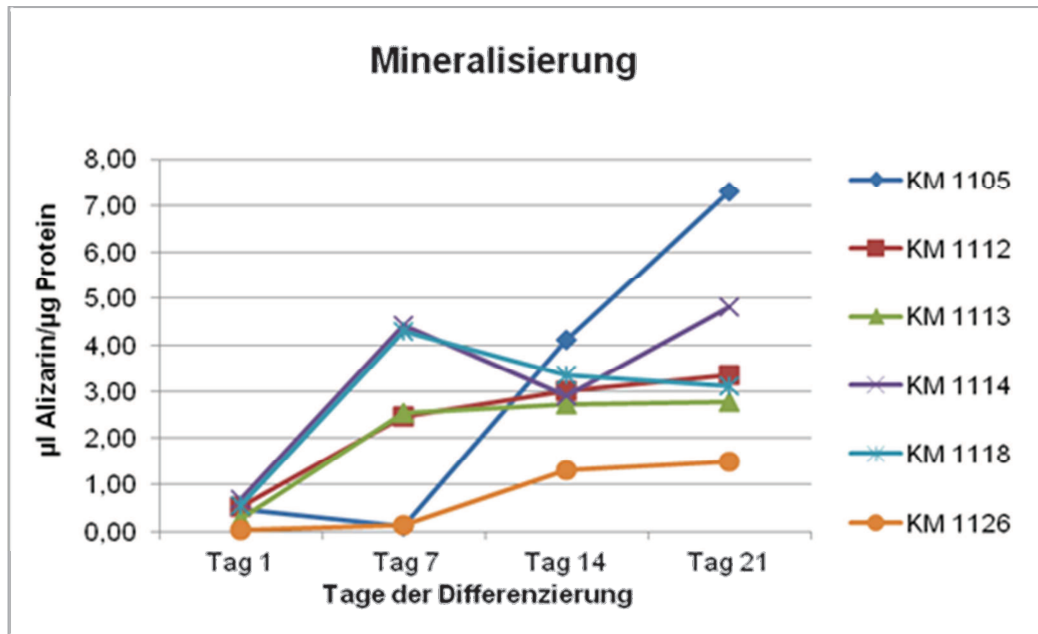
##### 3.2.1. Osteogene in vitro Differenzierung

Die Alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität sowie die Ablagerung einer mineralisierten extrazellulären Matrix in der Kulturschale gelten als Standardnachweise für die osteogene in vitro Differenzierung von MSC. Zu vier Zeitpunkten (Tag 1, 7, 14, 21 der Kultivierung) wurde der Grad der Mineralisierung mittels Alizarin Rot-Färbung, sowie die ALP-Aktivierung analysiert. Wie Abb. 10 und Abb. 11 zeigen, konnte eine effektive osteogene Differenzierung durch einen Anstieg beider Parameter während des Differenzierungsprozesses für alle untersuchten Spender nachgewiesen werden. Die quantitative Extraktion von Alizarin Rot pro µg Protein des Zelllysats ist in Abb. 10 dargestellt.

Für alle Spender konnte im Verlauf der Differenzierungszeit eine vermehrte Ablagerung einer mineralisierten Extrazellulärmatrix erhoben werden. Der Zeitpunkt der maximalen Mineralisierung variierte zwischen den Spendern (Abb.10). Teilweise war der Grad der Mineralisierung nach einem Maximum bei Tag 7 rückläufig (KM 1118, KM 1114), bei MSC anderer Spender stagnierte die Mineralisierung nach einem anfänglichen Anstieg von Tag 1 auf Tag 7 über den restlichen Zeitraum (KM 1112).



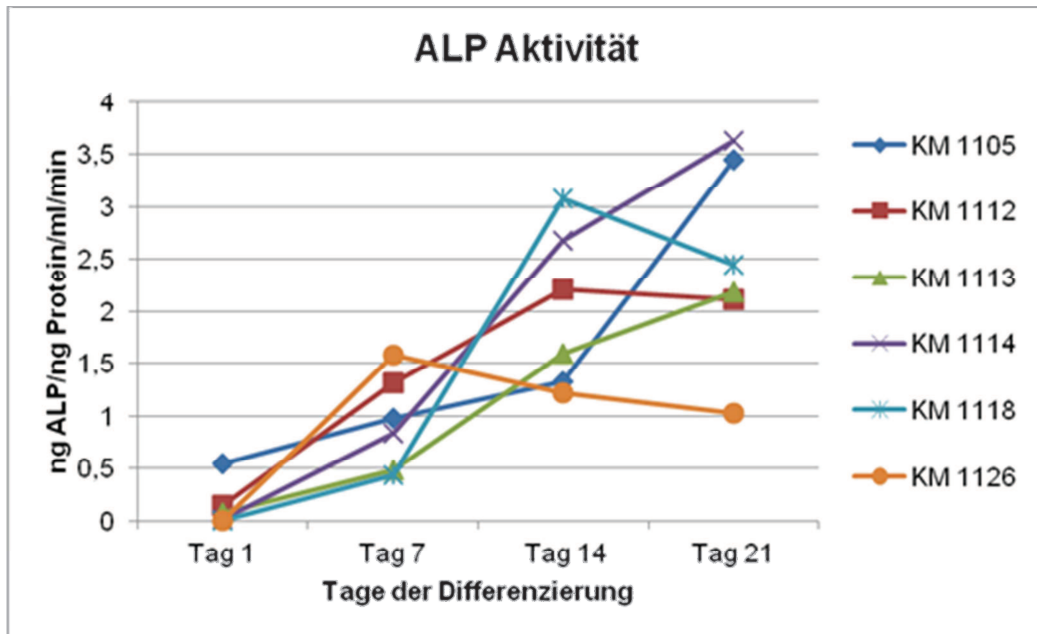
### 3. Ergebnisse



**Abb. 10 Mineralisierung in vitro osteogen differenzierter MSC (n=6 Spender).** Zu vier Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung wurde die abgelagerte, mineralisierte Extrazellulärmatrix mit Alizarin Rot gefärbt, nach waschen die Farbe extrahiert und die Absorption anschließend im ELISA-Reader gemessen. Die Ergebnisse wurden auf den Gesamtproteingehalt normiert. In allen untersuchten Proben war über den Zeitraum eine zunehmende Mineralisierung der extrazellulären Matrix zu beobachten.

Ebenso erfolgreich konnte die osteogene Differenzierung anhand einer zunehmenden ALP Aktivität bei MSC aller untersuchter Spender über den Zeitraum von 21 Tagen beobachtet werden (Abb.11). Auch bei der Enzymaktivierung variierten die Zeitpunkte der maximalen Aktivität zwischen den MSC. Bei MSC eines Spenders (KM 1126) nahm nach einem Anstieg von Tag 1 auf Tag 7 die ALP Aktivität wieder ab.

### 3. Ergebnisse

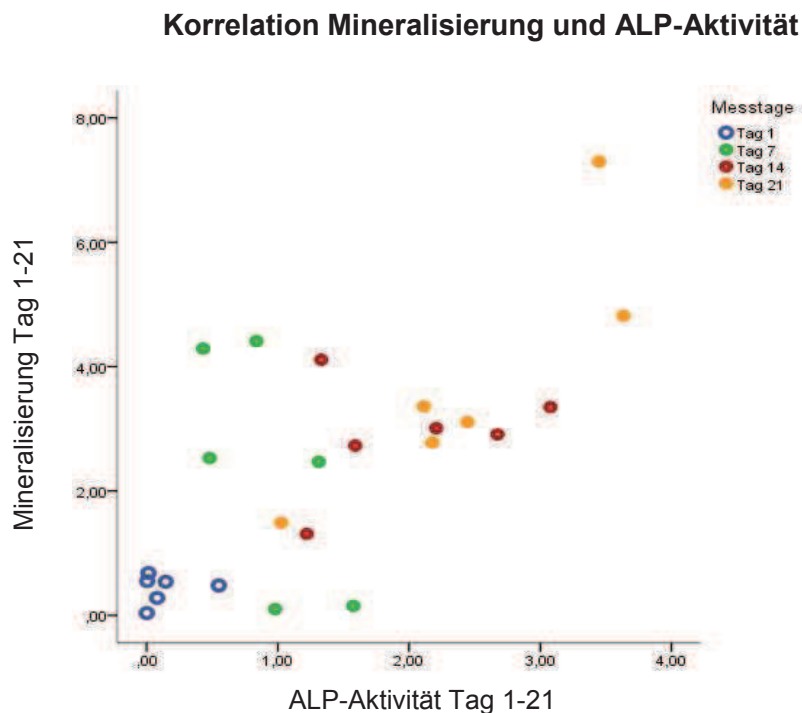


**Abb. 11 Ergebnisse der ALP-Aktivitätsbestimmung in vitro osteogen differenzierter MSC (n=6 Spender).** Der Verlauf der ALP-Aktivierung wurde durch Absorptionsmessung mittels ELISA-Reader zu vier Zeitpunkten bestimmt. Für alle untersuchten Spender war die Enzymaktivität über den gesamten Zeitraum nachweisbar.

Die höchsten Werte sowohl für ALP-Aktivität und Mineralisierung der Extrazellulärmembran erzielten MSC Spender KM 1105 und KM 1114 an Tag 21.

Um feststellen zu können, ob beide Parameter gleichermaßen quantitativ mit der osteogene Differenzierung einhergehen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Mineralisierungsgrad und der ALP-Aktivierung osteogen differenzierter MSC durchgeführt. Nach dem Pearson Korrelationskoeffizienten war eine stark positive Korrelation (0,8) hierfür an Tag 21 nachzuweisen, was bestätigt, dass zu diesem späten Zeitpunkt beide Marker zur Bestätigung der osteogenen Differenzierung herangezogen werden können. Korrelationen konnten an den anderen Tagen des Differenzierungszeitraums aufgrund der variablen Kurvenverläufe der verschiedenen Spender MSC nicht gefunden werden (Abb.12).

### 3. Ergebnisse

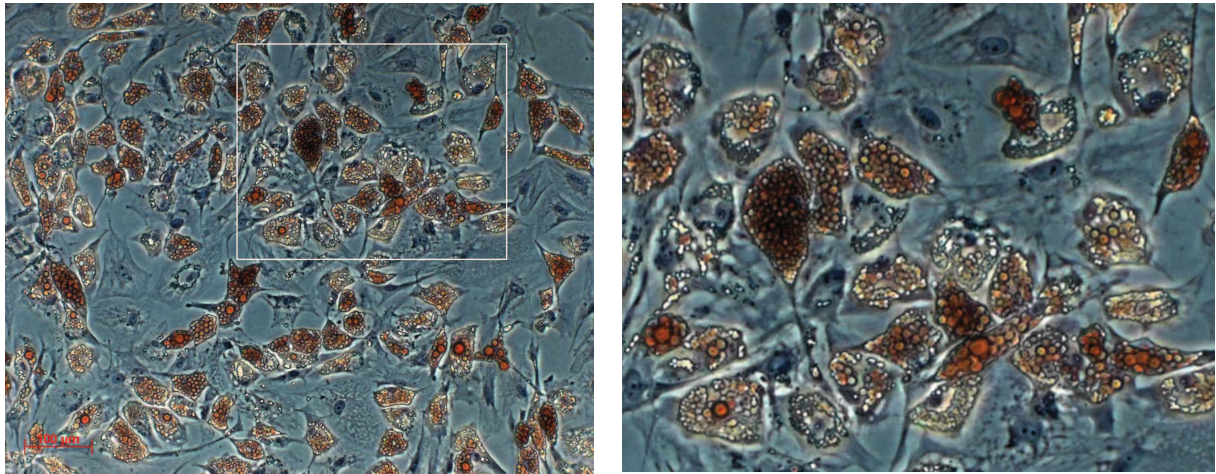


**Abb. 12** Untersuchung der Korrelationen zwischen ALP-Aktivität und Mineralisierungsgrad von sechs osteogen differenzierten Spender-MSC-Populationen mittels Pearson Korrelationskoeffizienten. Die Enzymaktivität sowie die Mineralisierung der extrazellulären Matrix wurden an vier Zeitpunkten des gesamten Kultivierungszeitraum bestimmt (Tag 1, 7, 14, 21). Es ergab sich eine stark positive Korrelation (0,8) an Tag 21.

#### 3.2.2. Adipogene in vitro Differenzierung

MSC-Populationen von 3 Spendern wurden in Doppelansätzen in adipogenem Medium kultiviert. Zur Auswertung der Adipogenese wurde der Zellrasen nach 14 Tagen mit Ölrot O gefärbt und die Differenzierung qualitativ beurteilt. Dabei handelt es sich um einen fettlöslichen Farbstoff, der Lipidtropfen rot färbt. Nach Induktion war in allen untersuchten MSC-Population eine erfolgreiche Adipogenese zu detektieren (Abb. 12).

### 3. Ergebnisse



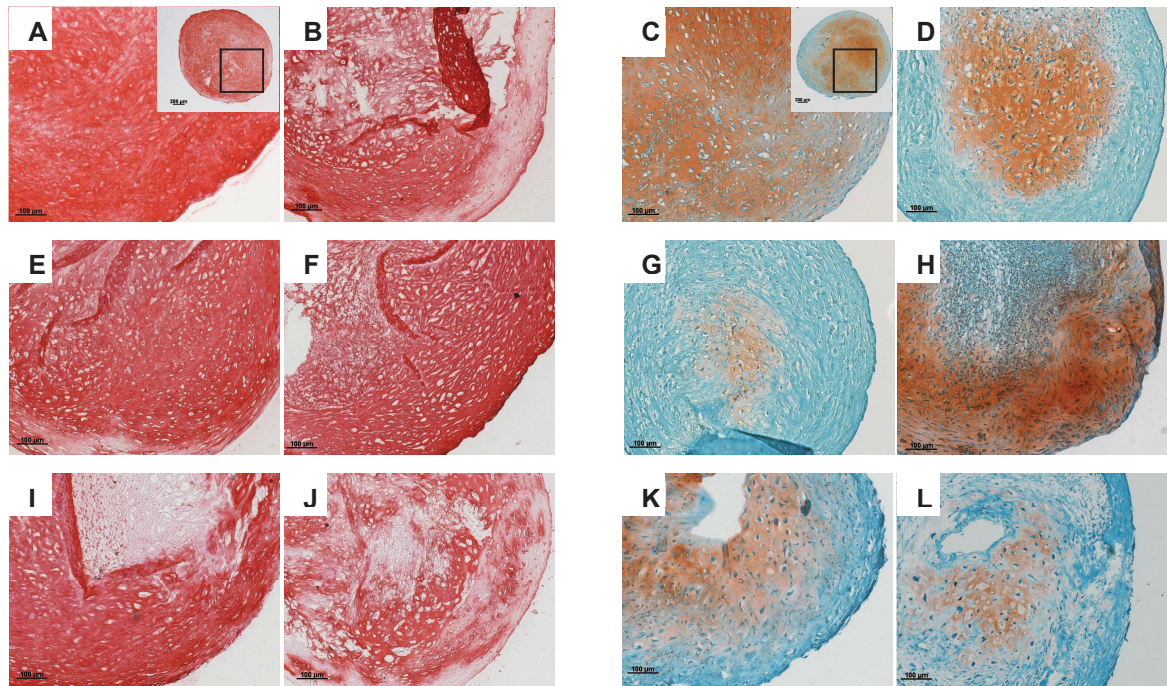
**Abb. 13 Adipogene in vitro Differenzierung.** Dargestellt sind repräsentative Bilder Ölrot O-gefärbter MSC-Populationen (KM 1118) nach 2 Wochen adipogener Differenzierung. Charakteristische rot gefärbte Öltropfen war in Zellvakuolen aller Proben nachweisbar (A: KM 1114; B: KM 1118; C: KM 1126).

#### 3.2.3. Chondrogene in vitro Differenzierung

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit wurden MSC-Populationen von 6 Spendern in Form von Sphäroiden in chondrogenem Medium kultiviert. Für eine qualitative Auswertung erfolgte nach 6 Wochen eine Proteoglykan-spezifische Safranin O-Färbung und eine immunhistochemische Kollagen Typ 2- Färbung an Paraffinschnitten. Wie in Abb. 14 (C,D,G,H,K,L) zu sehen ist, wird die chondrogene Differenzierung durch Produktion der Glykosaminoglykane, die für die Knorpelmatrix charakteristisch sind, durch die Braunfärbung deutlich. Immunhistochemisch gefärbte Schnitte zeigten Kollagen Typ 2-positive Sphäroide aller chondrogen differenzierten MSC-Populationen (Abb. 14 A,B,E,F,I,J). Unterschiede in Färbeintensitäten kommen durch unterschiedliche Expressionen von Proteoglykanen und Kollagen Typ 2 zu stande.



### 3. Ergebnisse

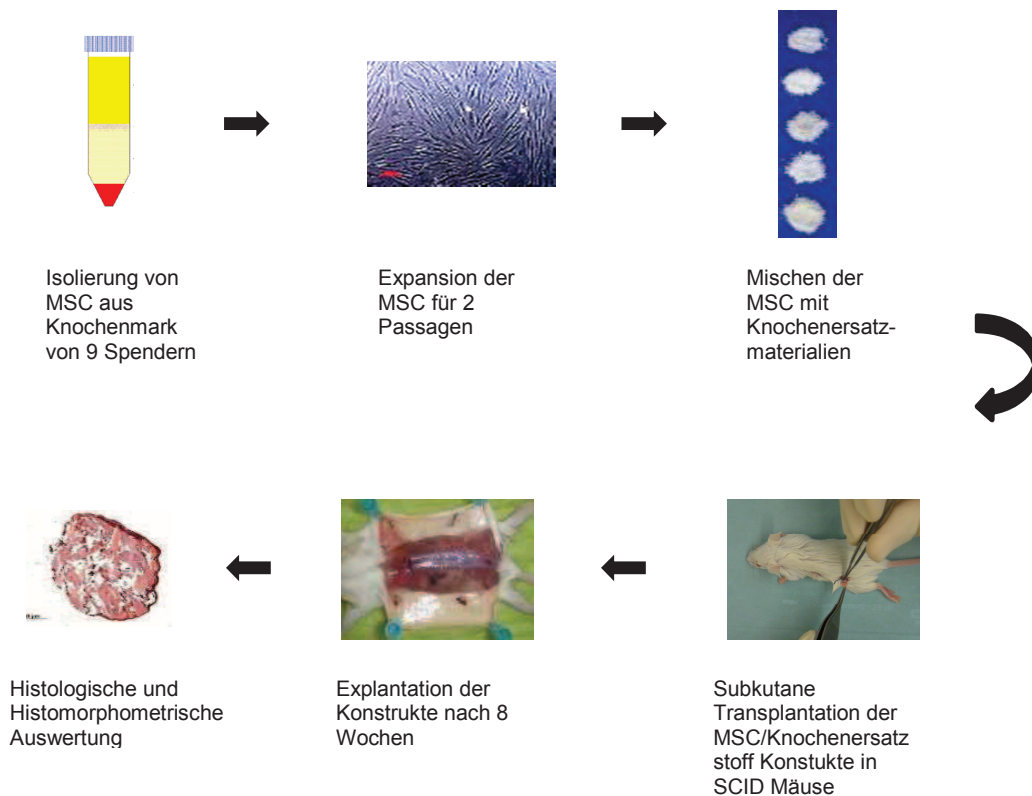


**Abb. 14 Histologische Analyse der in vitro Chondrogenese von 6 MSC-Spender-Populationen.** Dreidimensionale Sphäroide von MSC (n=6 Spender) wurden für 6 Wochen chondrogen differenziert. Im Anschluss wurden sie in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Kollagen Typ 2 (A,B,E,F,I,J) und Proteoglykanen (Safranin-O) (C,D,G,H,K,L). (A;C) KM 1105, (B;D) KM 1111, (E;G) KM 1112, (F;H) KM 1113, (I;K) KM1114, (J;L) KM1126.

Zusammengefasst konnte anhand der in vitro Versuche nachgewiesen werden, dass alle untersuchten MSC nach gezielter Induktion in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzierten. Diese Ergebnisse bestätigten die geforderte Multipotenz für alle untersuchten MSC-Populationen und lieferten somit zusammen mit den Isolierungsverfahren den Nachweis, dass es sich bei den implantierten Zellen tatsächlich um MSC handelte.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3. Ektope Knochenbildung in vivo



**Abb. 15 Versuchsaufbau.** Undifferenzierte MSC wurden für 2 Passagen expandiert und mit den 5 zu vergleichenden Knochenersatzmaterialien für 8 Wochen subkutan in SCID-Mäuse implantiert. Die ektope Knochenbildung wurde histologisch und histomorphometrisch bestimmt.

MSC aus Knochenmarkaspiraten von 9 Spendern im Alter von 22-79 Jahren, wurden isoliert und zunächst unter standardisierten Bedingungen in ES-Medium über 2 Passagen expandiert. Die Spender-abhängige Kultivierungsdauer variierte zwischen 13 und 19 Tagen. Bei ausreichender Zelldichte wurden die undifferenzierten Zellen jeweils mit den 5 zu vergleichenden Knochenersatzstoffen vermischt, um dann zusammen mit polymerisiertem Fibrin dreidimensionale Konstrukte herzustellen. Für jeden Ersatzstoff wurden pro Spender zwei Konstrukte angefertigt (n=18 pro Gruppe), zusätzlich wurden von jedem Material vier zellfreie Kontrollen hergestellt. Die Knochenersatzstoff-MSC-Konstrukte sowie die zellfreien Kontrollen wurden subkutan in SCID-Mäuse implantiert. Nach acht Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und die Konstrukte explantiert, fixiert und histologisch aufgearbeitet. Die ektope Knochenbildung wurde anhand H&E-gefärbter Schnitte histologisch und histomorphometrisch untersucht (s. Abb.15).

### 3. Ergebnisse

Insgesamt konnten 88 der 90 Konstrukte nach 8 Wochen explantiert werden. Jeweils ein bHA-C- und ein eHA-C-Konstrukt wurden an der Implantationsstelle nicht mehr aufgefunden. Bei der Explantation fiel auf, dass sich die eHA- und bHA/MSK Konstrukte während der Implantationszeit an den Wirtskörper anpassten und in der Form etwas abflachten. Eine leichte Größenreduktion fiel bei der Explantation kollagenhaltiger bHA-C und eHA-C Konstrukte auf, dabei wirkten die Konstrukte fester und kompakter als vor der Implantation.  $\beta$ -TCP/MSK-Konstrukte konnten nach 8 Wochen unverändert explantiert werden. Für keines der MSK/Knochenersatzstoff Konstrukte konnten Hinweise auf entzündliche Prozesse an der Explantationsstelle gefunden werden. Alle 88 explantierten Konstrukte konnten zur Auswertung herangezogen werden. Für 8 der 9 MSK-Spender-Populationen konnte in der  $\beta$ -TCP- sowie der eHA-C-Gruppe neuer Knochen gefunden werden, mit 94% positiver Konstrukte waren diese Materialien am erfolgreichsten. MSK eines Spenders (KM1114) bildeten unabhängig vom eingesetzten Knochenersatzmaterial kein neues Knochengewebe. Mit bHA-C und eHA konnten 64% bzw 61% der MSK-Konstrukte ektopen Knochen aufbauen. Mit einer nachweisbaren Knochenbildung in nur 33% der Konstrukte waren die Ergebnisse für bHA am schlechtesten. Zusätzlich war für diesen Ersatzstoff die größte Variabilität zwischen den beiden identischen Proben des selben Spenders zu beobachten: bei 4 der 9 Spender-MSK konnte in einem der beiden MSK/Knochenersatzmaterial-Konstrukte Knochenbildung nachgewiesen werden, während im Duplikat keine Knochenbildung stattfand. Die Spendervariabilität war mit 3 von 9 ebenfalls hoch für kollagenfreies eHA, während die kollagenhaltigen eHA-C und bHA-C jeweils nur mit MSK eines Spenders variable Ergebnisse erzielten. Ausschließlich einheitliche Ergebnisse erzielte nur  $\beta$ -TCP (Tab. 2).

### 3. Ergebnisse

**Tab. 2 Übersicht über MSC-Populationen und Ergebnisse der in vivo Studien nach histologischer Auswertung**

Spender	Alter	Kultivierung	bHA-C *	bHA *	eHA-C *	eHA *	β-TCP *
KM 1102	22	15	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2
KM 1118	37	17	0/2	1/2	2/2	2/2	2/2
KM 1126	41	14	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
KM 1114	55	19	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2
KM 1105	69	18	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2
KM 1104	71	16	0/1	1/2	1/2	1/2	2/2
KM 1112	73	14	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
KM 1113	75	13	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
KM 1111	76	13	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2
<b>Gesamt</b>	<b>MW: 58</b>	<b>MW: 15</b>	<b>11/17</b>	<b>6/18</b>	<b>15/17</b>	<b>11/18</b>	<b>16/18</b>
<b>[%]</b>			<b>64.7</b>	<b>33.3</b>	<b>88.2</b>	<b>61.1</b>	<b>88.9</b>

\*Anzahl der Konstrukte mit neuer Knochenbildung zur Gesamtzahl der explantierten Konstrukte

In allen H&E-gefärbten Schnitten war neu gebildetes Knochengewebe von Knochenersatzmaterial durch eine unterschiedliche Farbgebung zu differenzieren. Vor allem bei bHA, eHA und β-TCP war das Knochenersatzmaterial deutlich dunkler gefärbt als der neu gebildete rosa angefärbte Knochen. Für bHA-C und eHA-C waren zusätzlich die osteozytenfreien, leeren Lakunen in der Matrix des Ersatzmaterials zu erkennen, welche sich von der osteozytenreichen Matrix des neuen Knochengewebes unterschied (Schwarzer Pfeil Abb. 16 B und 17 A). Der neue Knochen entwickelte sich an der Oberfläche des Knochenersatzmaterials und expandierte in dessen Zwischenräume. Osteoblasten säumten den Rand des neuen Gewebes (Roter Pfeil Abb. 16 B und 17 A). Eine detaillierte Betrachtung der gefärbten Schnitte zeigte eine variable Menge an ektopter Knochenbildung bei den unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien. Von großen, zusammenhängenden Geflechtknochen, vor allem für die kollagenhaltigen Knochenersatzstoffe, bis hin zu kleinem, verteilt vorkommenden neu gebildetem



### 3. Ergebnisse

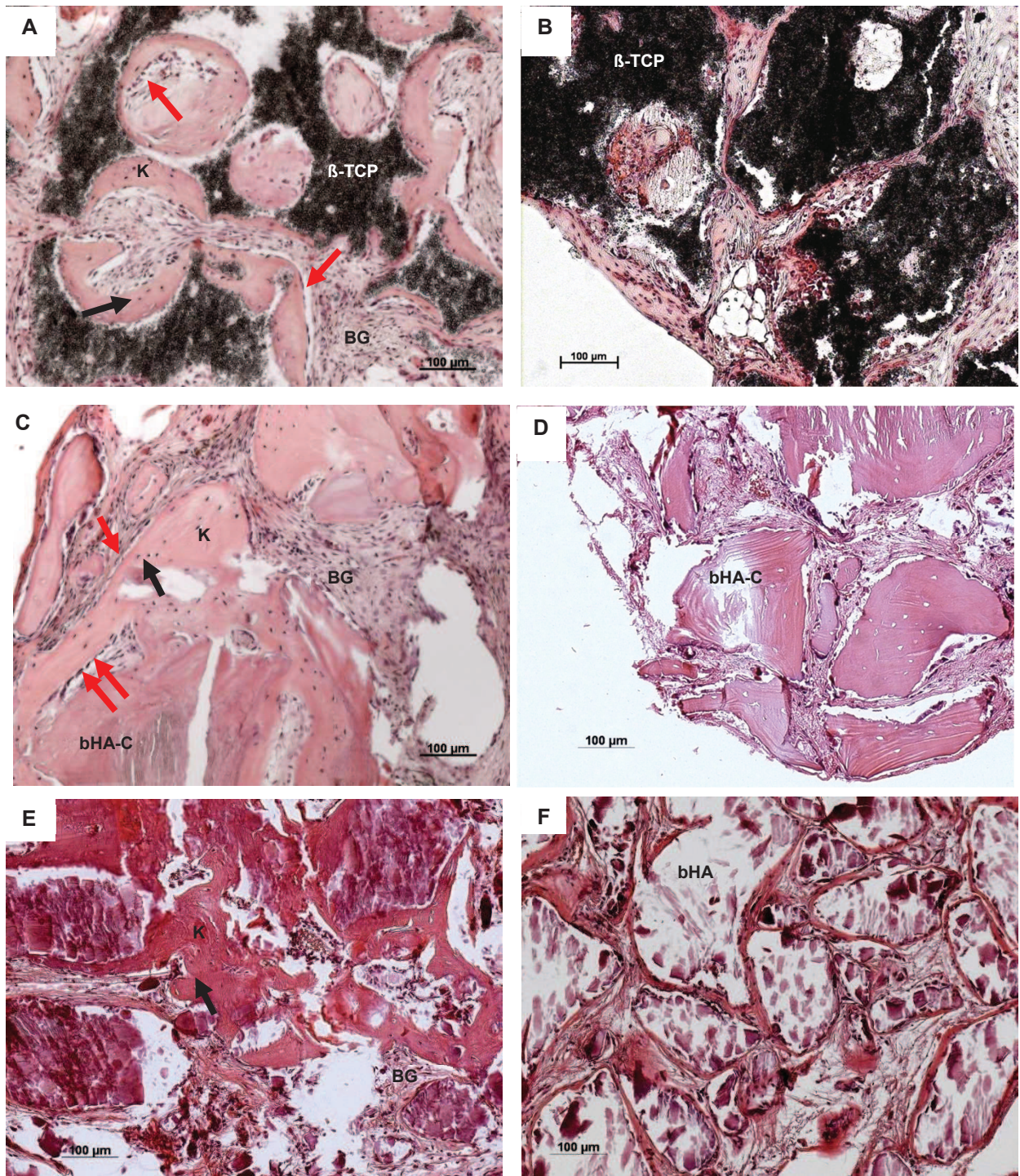
Knochen besonders bei kollagenfreiem bHA und eHA.

Alle zellfreien Konstrukte (4/Knochenersatzstoff) konnten nach 8 Wochen explantiert werden. Im Gegensatz zu den MSC besiedelten Knochenermaterial-Konstrukten fielen bei den zellfreien Kontrollgruppen keine morphologischen Veränderungen der Explantate nach auf. In keiner der zellfreien Konstrukte konnte neu gebildetes Knochengewebe gefunden werden (Abb. 16 B,D,F; 17 B,D).

Vor dem Hintergrund, dass durch implantierte MSC vermehrt Wirtszellen rekrutiert werden könnten wurde der Gesamtzellgehalt in Schnitten von jedem Knochenersatzmaterial (je 4 Spender) sowie in MSC-freien Knochenersatzmaterial an 2 repräsentativen Stellen pro Schnitt ausgezählt. Die Zellgehalte zwischen MSC-freien und MSC-haltigen Konstrukten unterschieden sich nicht auffällig. Im Durchschnitt war der Zellgehalt in MSC freien Schnitten mit 71 Zellen pro Bildausschnitt sogar höher als in MSC haltigen mit 56 (Tab.3).

Tab. 3 Zellgehalt in H&E gefärbten Schnitten nach 8 Wochen in vivo Kultivierung in SCID Mäusen. Im Vergleich Konstrukte ohne und mit implantierten MSC

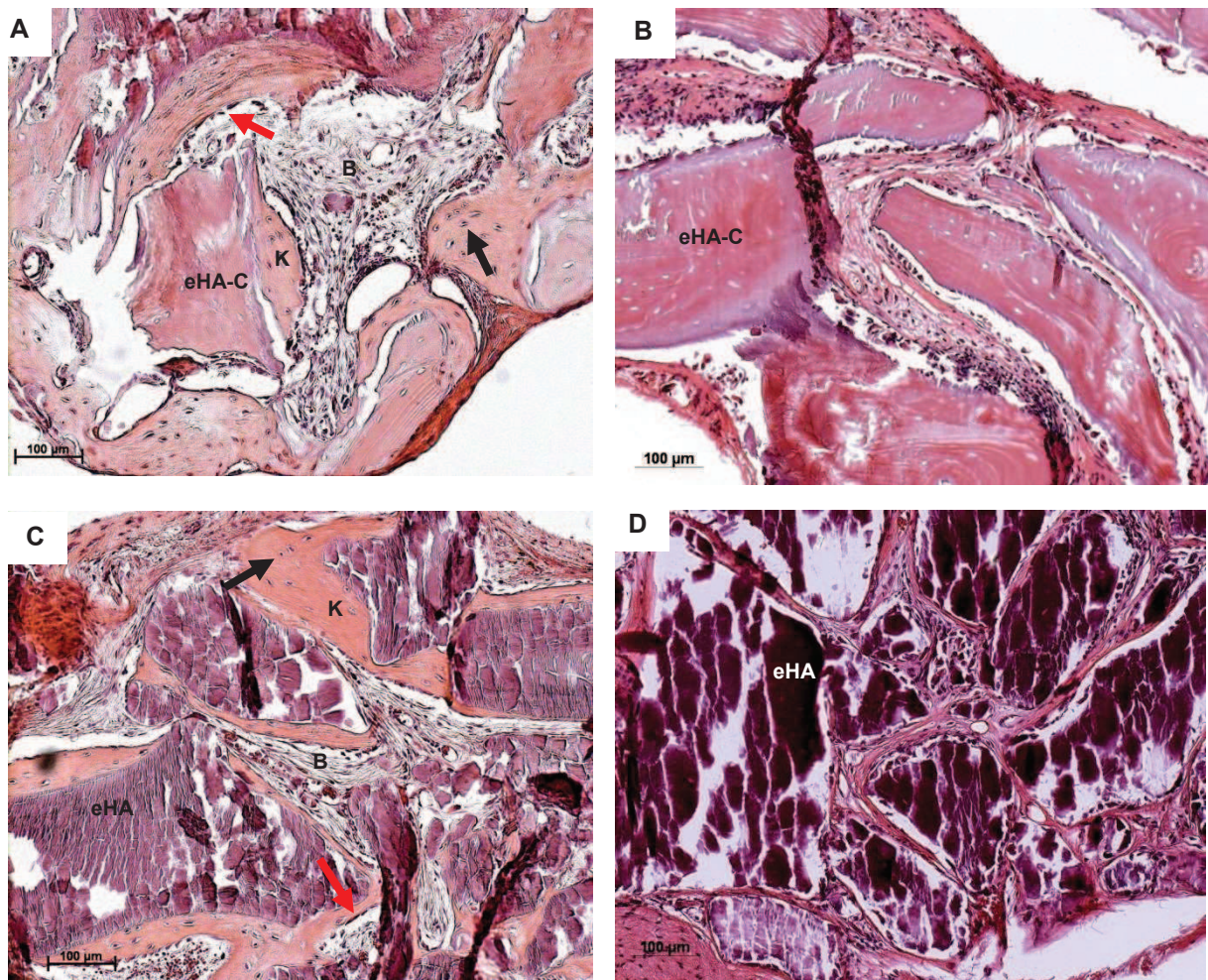
	Konstrukte mit MSC (n=4)	Konstrukte ohne MSC (n=4)
<b>bHA-C</b>	85	86
<b>bHA</b>	46	84
<b>eHA-C</b>	43	73
<b>eHA</b>	51	67
<b>β-TCP</b>	56	49
<b>Durchschnitt</b>	56	71



**Abb. 16 Histologische Untersuchung der ektopen Knochenbildung humaner MSC von 9 Spendern auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien.** Zu sehen sind repräsentative Bilder H&E-gefärbter Schnitte von Explanaten 8 Wochen nach Implantation in SCID-Mäuse. Die linke Seite (A,C,E) zeigt MSC-besiedelte Konstrukte von  $\beta$ -TCP (A), bHA-C (C), und bHA (E). Neuer Knochen (K) expandiert an der Oberfläche des Ersatzmaterials, während Bindegewebe (BG) die Zwischenräume füllt. Die Implantation MSC-freier Konstrukte der Biomaterialien  $\beta$ -TCP, bHA-C und bHA zeigten keine Knochenbildung (B, D, F). Die roten Pfeile deuten auf Knochenmatrix anlagernde Osteoblasten, schwarze Pfeile zeigen in die Matrix des neuen Knochens eingebettete Osteozyten.



### 3. Ergebnisse



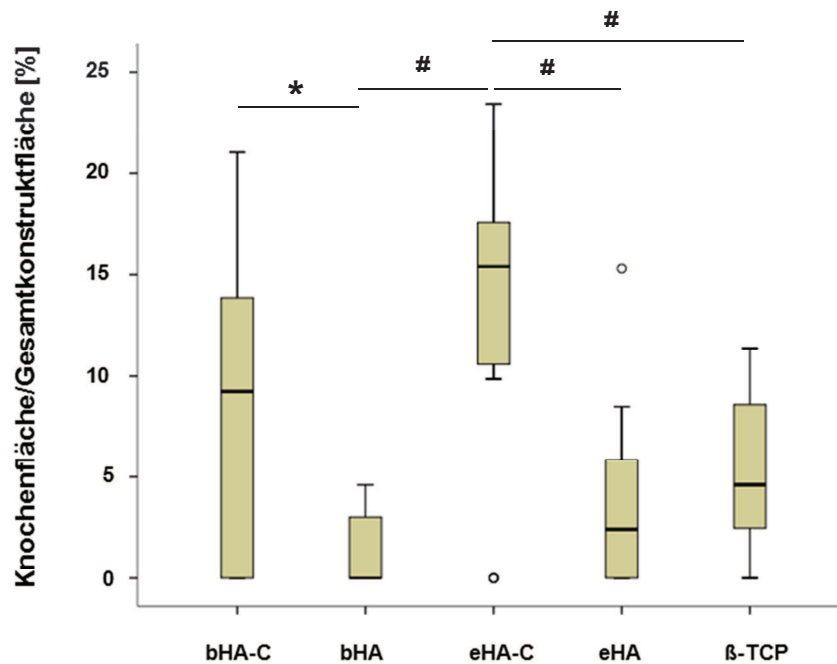
**Abb. 17** Repräsentative Bilder H&E-gefärbter Schnitte der MSC-besiedelten eHA-C (A) und eHA- Konstrukte (C) nach 8 Wochen in vivo. Ergebnisse der in vivo Implantation dieser Materialien ohne MSC sind in (B) für eHA-C und (D) für eHA zu sehen. Neuer Knochen (K) entstand an der Oberfläche der Materialien, die Zwischenräume waren mit Bindegewebe gefüllt. Knochenersatzmaterialien ohne MSC, eHA-C (B) and eHA (D) zeigten keinen Knochenbildung nach 8 Wochen in vivo. Die roten Pfeile deuten Osteoblasten aus, schwarze Pfeile zeigen in die Matrix des neuen Knochens eingebettete Osteozyten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4. Histomorphometrie und statistische Auswertung

Zur quantitativen Auswertung der ektopen Knochenbildung wurden von jedem Konstrukt 2 H&E-gefärbte Schnitte aus 3 unterschiedlichen Ebenen mittels Adobe Photoshop bearbeitet und der prozentuale Anteil neu gebildeten Knochengewebes an der Fläche des Gesamtkonstrukts durch ImageJ ermittelt. Aus 6 Schnitten wurde jeweils der Mittelwert der neuen Knochenfläche an der Gesamtfläche gebildet, die Mittelwerte wurden wiederum für jede Untersuchungsgruppe zusammengefasst, dass heißt pro Spender und Biomaterial gingen 1 bzw. 2 Konstrukte in die Wertung ein ( $n=18$  für  $\beta$ -TCP, b-HA, eHA;  $n=17$  für eHA-C, bHA-C) (Abb. 18). Schnitte ohne Knochenbildung wurden mit 0% gewertet. Konstrukte die nicht aufgefunden werden konnten gingen nicht mit in die Bewertung ein. Für die Positivkontrolle  $\beta$ -TCP wurde im Mittel 5,09% neue Knochenfläche nachgewiesen. Die kollagen-haltigen Materialien eHA-C mit 13,36% und bHA-C mit 8,13% zeigten im Mittel die größte Knochenfläche. Die kollagen-freien Proben eHA mit 3,14% und bHA mit nur 1,47% schnitten schlechter ab als die anderen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für bHA-C im Vergleich zu bHA ( $p=0,027$ ) gefunden (\*). Für eHA-C war signifikant mehr ektopen Knochenbildung im Vergleich zu b-HA ( $p<0,005$ ), eHA ( $p<0,005$ ) und  $\beta$ -TCP ( $p=0,003$ ) zu ermitteln (#). Zwischen den kollagenhaltigen Materialien (eHA-C, bHA-C) waren keine signifikanten Unterschiede zu finden.

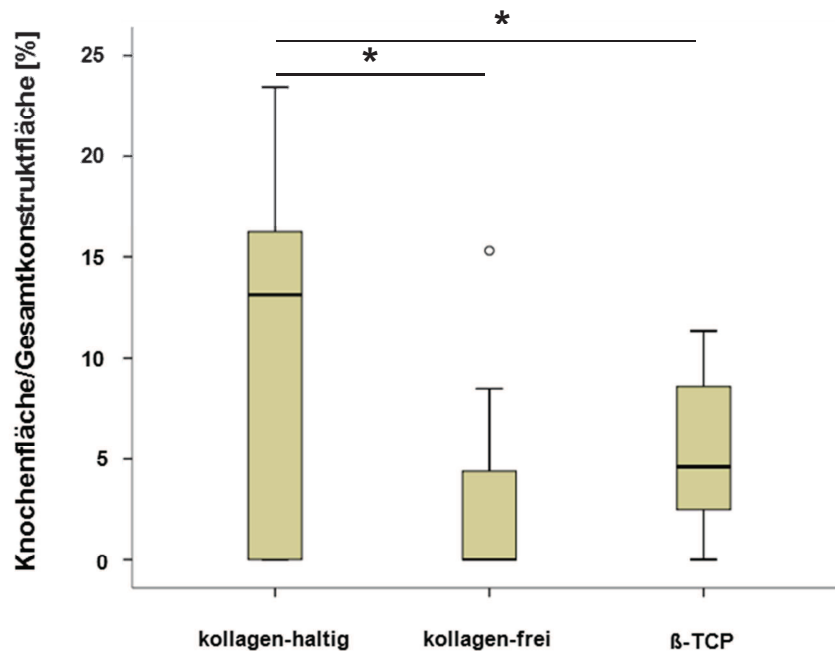
### 3. Ergebnisse



**Abb. 18 Histomorphometrische Analyse der ectopen Knochenbildung von humanen MSC (n=9) auf 5 verschiedenen Knochenersatzmaterialien.** Die Mittelwerte des prozentualen Anteils neu gebildeten Knochens an der Gesamtfläche des Konstrukts wurden berechnet und statistisch bewertet. Verglichen wurden die Mittelwerte von 18 (β-TCP, eHA, bHA) bzw. 17 (bHA-C, eHA-C) Knochenersatzmaterial-MSC-Konstrukten (1 bzw. 2 Konstrukte pro Spender und Biomaterial). Für die Auswertung wurden von jedem Konstrukt 2 H&E-gefärbte Schnitte aus 3 verschiedenen Ebenen verglichen. Signifikant mehr Knochen war für die bHA-C- als für die b-HA-Gruppe ( $p=0.027$ ) zu finden (\*). eHA-C zeigte signifikant mehr Knochen als b-HA ( $p<0.001$ ), eHA ( $p<0.001$ ) und β-TCP ( $p=0.003$ ) (#). Das Signifikanzniveau wurde mit  $p<0,05$  festgesetzt.

Um zu ermitteln ob es signifikante Unterschiede in der Knochenbildung zwischen kollagen-haltigen, kollagen-freien sowie synthetischem β-TCP gibt, wurden die Mittelwerte der gebildeten Knochenfläche in Gruppen nach kollagen-haltigen (eHA-C und bHA-C), kollagen-freien (eHA, bHA) und synthetischen (β-TCP) Materialien zusammengefasst und statistisch bewertet (Abb. 19). Die kollagen-haltigen Materialien bildeten statistisch signifikant ( $p<0,05$ ) mehr Knochen als die beiden Vergleichsgruppen (Abb. 1).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 19 Statistischer Vergleich von neu gebildetem Knochengewebe pro Gesamt-konstruktfläche aller MSC-Knochenersatzstoff-Konstrukte**, zusammengefasst in die Gruppen kollagen-haltig (bHA-C, eHA-C), kollagen-frei (bHA, eHA) und synthetisches β-TCP. Die kollagenhaltigen Knochenersatzstoffe zeigten statistisch signifikant mehr neue Knochenfläche als die kollagenfreie Gruppe und β-TCP (\*,  $p < 0,05$ ).

Wurden die Ergebnisse der ektopen Knochenbildung aller untersuchten Proben equiner Herkunft mit denen boviner Herkunft und synthetischem β-TCP verglichen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.

Zusammenfassend schnitt das biologische Knochenersatzmaterial, eHA-C im Vergleich mit allen anderen getesteten Materialien am besten ab. Vergleichbar mit den Ergebnissen der eingesetzten Positivkontrolle β-TCP (16/18) waren die meisten Konstrukte mit nachweisbarer Knochenbildung für eHA-C (15/17) zu finden. eHA-C zeigte außerdem den höchsten Mittelwert der Knochenfläche an der Gesamtfläche und war das einzige natürliche Ersatzmaterial, das signifikant mehr neuen Knochen bildete als die Positivkontrolle β-TCP. Nur ebenfalls kollagen-haltiges bHA-C zeigte ähnlich hohe Mittelwerte wie eHA-C.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4. In Situ-Hybridisierung

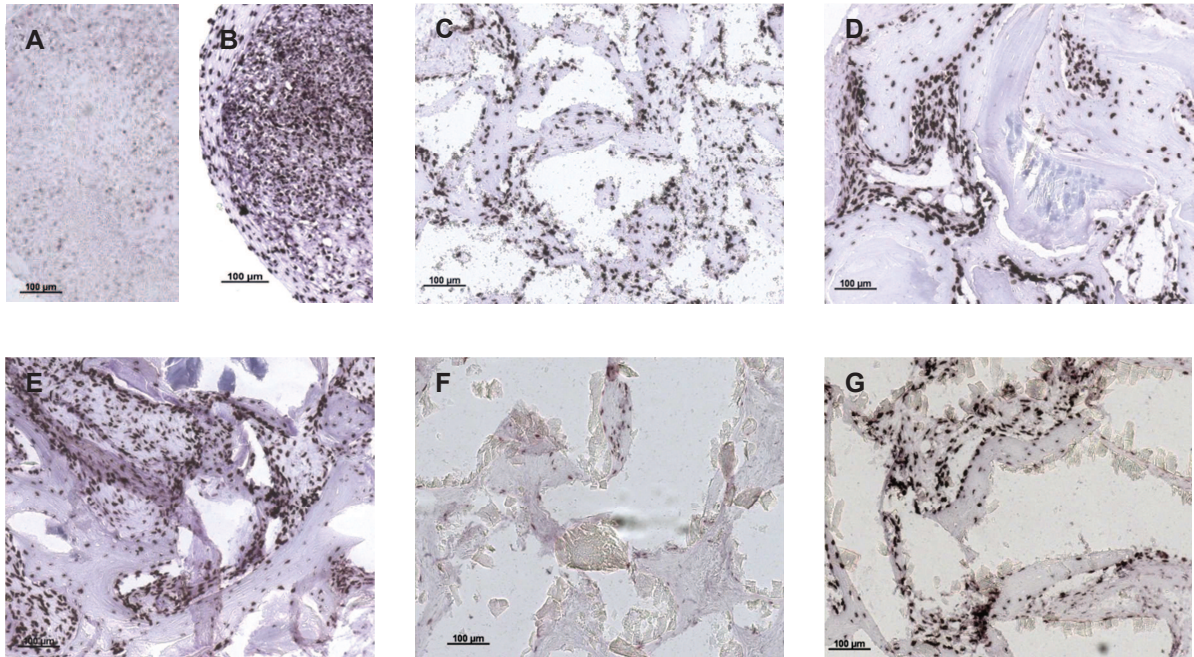
Ob das neue Knochengewebe durch die implantierten humanen MSC oder durch eingewanderte murine Wirtszellen entstanden ist, wurde durch in Situ-Hybridisierung an ausgewählten Schnitten von MSC-Knochenersatzstoff-Explantaten untersucht. Human-spezifische genomische ALU-Sequenzen und Maus-spezifische SINE B1/B2- Sequenzen wurden mit Dioxigenin-markierten Proben identifiziert.

Für die ALU in Situ-Hybridisierung dienten Paraffinschnitte humaner MSC-Sphäroide als Positivkontrolle (Abb. 20B), Schnitte muriner Zellpellets als Negativkontrolle (Abb. 20A). In Schnitten der MSC-Knochenersatzmaterial-Explantate konnten positive Signale als dunkelviolett gefärbte Zellen in der Matrix des neuen Knochens gefunden werden. Zahlreiche humane Zellen konnten auch in der direkten Umgebung sowie angelagert an die entstanden Knochenfläche detektiert werden (Abb. 20 C-G). Das positive Signal hob sich deutlich von der hellvioletten Färbung der Negativkontrolle ab.

Zum Nachweis Maus-spezifischer SINE B1/B2-Sequenzen dienten murine Sphäroide als Positivkontrolle (Abb. 21B) und Schnitte humaner MSC-Sphäroide als Negativkontrolle (Abb. 21A). In gefärbten MSC-Knochenersatzmaterial-Konstrukten waren positive Signale als Nachweis muriner Zellen vor allem in der Peripherie des neu entstandenen Knochengewebes zu finden. In der neu entstanden Knochenmatrix färbten sich die Zellen nicht an (Abb. 21 C-G).



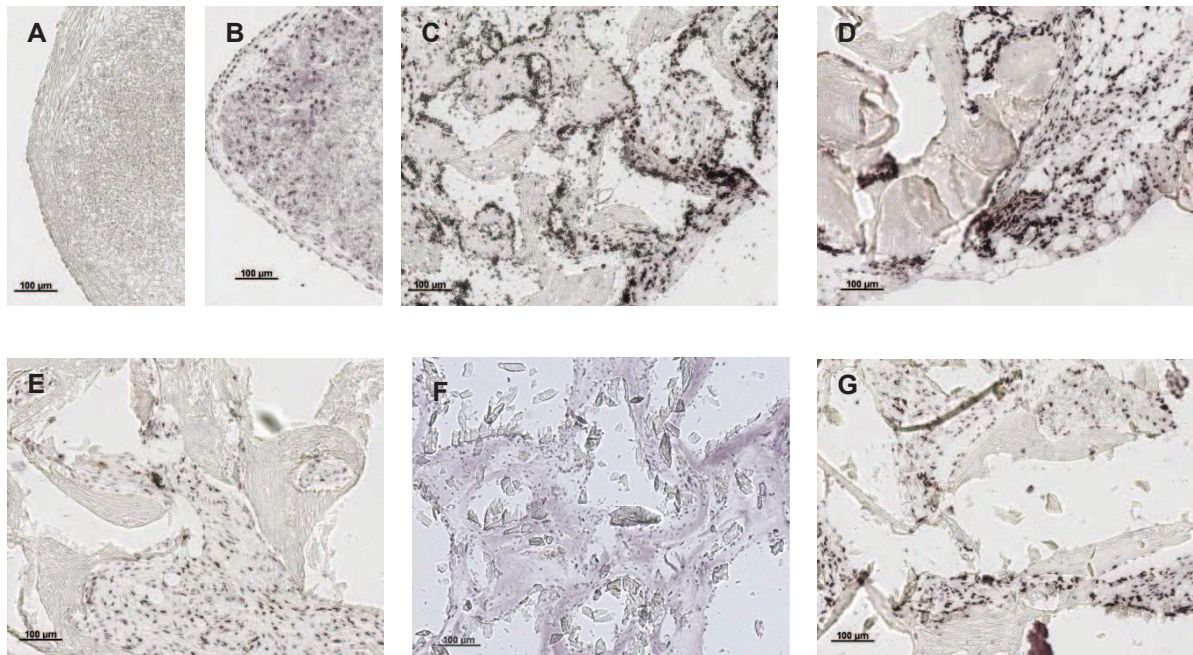
### 3. Ergebnisse



**Abb. 20 In Situ-Hybridisierung mit Dioxigenin-markierten Sonden zur Detektion human-spezifischer ALU-Sequenzen.** Gezeigt sind repräsentative Bilder ausgewählter Paraffinschnitte humaner MSC-Knochenersatzstoff-Konstrukte nach 8 Wochen in vivo Kultivierung in SCID-Mäusen (C-G). (A) Gewebeschnitte von Sphäroiden mit Mauszellen als Negativkontrolle, (B) Paraffinschnitte von Fibrin-Sphäroiden mit humanen Zellen als Positivkontrolle, (C)  $\beta$ -TCP, (D) bHA-C, (E) eHA-C, (F) bHA, (G) eHA. Die Färbung zeigte, dass neuer Knochen durch die Tätigkeit implantierter humaner Zellen stammt.



### 3. Ergebnisse



**Abb. 21 SINE B1/B2 in situ-Hybridisierung von Paraffinschnitten humaner MSC-Ersatzmaterial-Konstrukte nach 8 Wochen in vivo Kultivierung in SCID-Mäusen.** Mit Dioxigenin-markierten Sonden wurden die Proben auf Maus-spezifische repetitive SINE B1/B2-Sequenzen untersucht. Von jedem Ersatzstoff wurden repräsentative Schnitte jeweils von unterschiedlichen Spendern beurteilt. (A) Fibrin-Sphäroid mit humanen MSC als Negativkontrolle, (B) murine Zellen in einem Fibrin-Sphäroid als Positivkontrolle(C). Die Färbung zeigt, dass sich murine Zellen bei allen untersuchten Proben außerhalb der Matrix des neuen Knochengewebes befinden: (C)  $\beta$ -TCP, (D) bHA-C, (E) eHA-C, (F) bHA, (G) eHA.

Anhand der in Situ-Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, dass der neue Knochen unabhängig vom verwendeten Knochenersatzmaterial durch die Tätigkeit implantierter humaner Zellen entstanden war. Es gab keine Hinweise auf eine Beteiligung muriner Wirtszellen an der Entstehung des Knochengewebes in untersuchten MSC/Knochenersatzmaterial Konstrukten.

## 4. Diskussion

Frakturen mit großem Verlust von Knochengewebe stellen ein großes klinisches Problem dar. Goldstandard zur Behandlung solcher Defekte ist die Rekonstruktion mit autologem Knochenersatz, dessen Einsatz durch Probleme wie eine limitierte Verfügbarkeit oder zusätzliche operative Eingriffe beschränkt ist. Eine vielversprechende Alternative hierzu stellt das *Tissue Engineering* dar: Trägermaterialien werden mit Wachstumsfaktoren und Zellen versehen und in die Defektstelle transplantiert. Sauerbier et al. konnten nach Rekonstruktion von Knochendefekten mit Transplantaten aus konzentriertem Knochenmark in Kombination mit biologischen Knochenersatzmaterialien eine vergleichbare Knochenneubildung wie bei der Verwendung von autologem Knochen finden und sehen darin ein praktikables Ersatzverfahren (Sauerbier et al. 2011). Problem ist, dass keines der auf dem Markt befindlichen Knochenersatzstoffe die an Trägermaterialien gestellten Anforderungen zu 100% erfüllt (Schmidt- Rohlffing et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurden die ektope Knochenbildung humaner MSC mit kommerziell erhältlichem synthetischem, neu entwickelten sowie bereits etablierten biologischen Knochenersatzmaterialien verglichen, um ihre Eignung als Trägermaterialien zu untersuchen. Hintergrund sind bereits abgeschlossene Studien in unserem Labor in denen humane MSC gesiedelt auf synthetischem  $\beta$ -TCP erfolgreich ektope Knochenbildung induzierten, allerdings nicht für alle eingesetzten Spender MSC (Janicki et al. 2010, 2011). Untersucht werden sollte nun, ob die Ergebnisse dieser Studie durch den Einsatz biologischer Knochenersatzmaterialien verbessert, und MSC aller Spender erfolgreich und reproduzierbar zur Knochenbildung angeregt werden können. Biologische Knochenersatzstoffe integrieren sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu humanen Knochen optimal in das Wirtsgewebe und sollen so die Gewebeheilung im menschlichen Körper fördern (Smeets et al. 2010). Zum Vergleich kamen ein neu entwickelter, aus Pferdeknochen gewonnener Knochenersatzstoff, aus HA und Kollagen bestehend (eHA-C), equines HA ohne Kollagen (eHA), kommerziell erhältliches, monophasisches natürliches HA bovinen Ursprungs (bHA), ein bereits klinisch angewandeter, aus Rinderknochen gewonnener Ersatzstoff (bHA-C) und synthetisches  $\beta$ -TCP, aufgrund der Ergebnisse vergangener Studien als

#### 4. Diskussion

Positivkontrolle. Besonders sollte auch auf den Einfluss von Kollagen als Bestandteil von biologischen Knochenersatzstoffen auf die Knochenbildung geachtet werden.

#### **Diskussion der Methodik**

##### **Nachweis der Multipotenz humaner MSC**

Knochenmark dient häufig als Quelle für die Isolierung humaner MSC, die wiederum für die unterschiedlichsten *Tissue Engineering*-Techniken eingesetzt werden (Hodgkinson et al. 2009). Da im Knochenmark neben multipotenten MSC zahlreiche weitere Zellen vorkommen, wurden die in dieser Studie verwendeten Zellen anhand der klassischen Multipotenz Assays auf ihre Stammzeleigenschaften untersucht (Dominici et al. 2006). Alle untersuchten MSC-Populationen konnten nach Induktion in vitro in Fettzellen, Knorpelzellen und Knochenzellen differenzieren. Es konnte also sichergestellt werden, dass es sich bei den Zellen, mit denen in vivo gearbeitet wurde, um humane MSC handelte.

##### **Wahl des Tierversuchsmodells**

Da die Knochenbildung ein sehr komplexer Prozess ist, führen in vitro Stimulierungen nur zu eingeschränkten Aussagen (Urist et al. 1994). Dagegen existieren zur Untersuchung der Knochenbildungsfähigkeit humaner MSC in Kombination mit Knochenersatzmaterialien in vivo ektope (Krebsbach et al. 1997, Muraglia et al. 1998) und orthotope (Purleacher et al. 1996, Quarto et al. 2001, Wippermann et al. 1999, Gebhart et al. 1991) Implantationsmodelle. In vorangehenden Studien in unserem Labor wurde ein ektope Tiermodell zur Untersuchung der Knochenbildungsfähigkeit humaner MSC nach subkutaner Implantation in SCID-Mäuse etabliert und damit erfolgreich die ektope Knochenbildung humaner MSC auf synthetischen Trägermaterialien induziert (Janicki et al. 2010). Humane MSC besitzen eine höhere klinische Relevanz als murine Zellen und wurden daher auch in dieser Studie verwendet. Anhand dieses

#### 4. Diskussion

Modells kann zwar die organisierte Struktur eines harten elastischen Knochens nicht nachgeahmt werden, dennoch gewährleistet die subkutane Umgebung die für die Knochenbildung erforderliche Durchblutung. Im Gegensatz zum orthotopen Modell fehlen jedoch osteogene oder parakrine Einflüsse sowie mechanischer Stress durch das Zielgewebe (Bareille et al. 2000, Kasten et al. 2006). Des Weiteren sind implantierte MSC im ektopen Modell durch die zunächst geringe Durchblutung extremen Bedingungen zur Knochenbildung ausgesetzt. Ohne Berücksichtigung solcher äußeren Einflüsse können die verschiedenen Knochenersatzstoffe jedoch gut miteinander verglichen werden und anhand der Ergebnisse der abgeschlossenen Studien ließ sich der Versuchsaufbau standardisieren. Um wirtsabhängige Einflüsse zu reduzieren wurden stets unterschiedliche Knochenersatzmaterialien in ein Tier implantiert. Da bei fehlender Knochenbildung für ein Material entweder das zweite Konstrukt mit dem identischen Material oder das gleichzeitig implantierte andere Material ein positives Resultat zeigte, konnten der Wirt als Faktor für eine fehlende Knochenbildung ausgeschlossen werden. Auch die Implantationsstelle der Konstrukte konnte nicht als Ursache gesehen werden, da sowohl nach thorakaler oder abdominaler Implantation Konstrukte mit und ohne Knochenbildung isoliert wurden. Damit können auch eventuelle mechanische Kräfte durch Bewegungen der Maus aufgrund der Wahl der Implantationsstelle ausgeschlossen werden. Da die MSC-Populationen grundsätzlich Knochenbildung zeigten, konnte generell die Fähigkeit humaner MSC, im ektopen Tiermodell die Bildung neuen Knochens zu induzieren, nachgewiesen werden.

#### **Diskussion der Untersuchungsergebnisse**

In der vorliegenden Studie wurde die Induktion der ektopen Knochenbildung humaner MSC von 9 Spendern auf 5 verschiedenen Materialien untersucht. Die MSC-Knochenersatzstoff-Konstrukte sowie zellfreie Kontrollgruppen wurden für 8 Wochen subkutan in SCID Mäuse transplantiert und die gebildete Knochenfläche anschließend histologisch und histomorphometrisch bestimmt.

##### **Standardisierung der eingesetzten Materialien**

Als Positivkontrolle wurde in der vorliegenden Studie phasenreines synthetisches  $\beta$ -TCP eingesetzt, da es zur Knochenregeneration bereits in vielen tierexperimentellen Studien erfolgreich verwendet wurde (Kasten et al. 2005, Jensen et al. 2006). Allerdings konnte mit  $\beta$ -TCP nur für ca 69% der Spender-MSC-Populationen ektope Knochenbildung nachgewiesen werden. Meist handelte es sich um Spender supoptimaler MSC-Qualität (Janicki et al. 2010, 2011). In dieser Studie sollte daher durch den Einsatz biologischer Knochenersatzstoffe die Knochenbildungsfähigkeit humaner MSC optimiert werden. Granulate wurden eingesetzt, da ihre lockere Verbindung durch den Fibrinkleber eine gute Durchmischung mit MSC ermöglicht und so vermutlich auch mehr Platz für einwandernde Blutgefäße geboten ist. Die Granulatgröße beeinflusst die ektope Knochenbildung vor allem durch Bereitstellung der spezifischen Oberfläche zur Anheftung von Zellen (Mankani et al. 2001). Alle Ersatzstoffe wurden auf eine Partikelgröße von 0,25-1mm standardisiert, da sich dieser Größenbereich bereits für die Knochenbildung als erfolgreich erwiesen hat (Janicki et al. 2010).

##### **Die Porosität des Materials beeinflusst die Regeneration von Knochengewebe**

Die Porosität ist ein kritischer Parameter für eine erfolgreiche Knochenbildung; sie erhöht die Vaskularisierung und ermöglicht den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen, was schließlich die Zellproliferation verbessert (Takahashi et al. 2004). Nach Niedhart et al. sollten Knochenersatzmaterialien als Voraussetzung für das Einwachsen von Kapillaren und Knochenzellen in den Defektraum Poren in einer Größe von 150–400  $\mu$ m besitzen, die miteinander in Verbindung stehen (Niedhart et al. 1998). Hertz et al. sehen eine Porengröße von 150-500  $\mu$ m als optimal für das Einwachsen von Knochen und die Absorption des Implantats (Hertz 2007). bHA-C und eHA-C werden aus Oberschenkelknochen von Pferden bzw. Rindern gewonnen, unterscheiden sich allerdings im Aufarbeitungsprozess.

#### 4. Diskussion

eHA-C wird in einem schonenden Aufreinigungsverfahren so bearbeitet, dass die natürliche Knochenstruktur erhalten bleibt. Das Material besitzt ein bipolares System aus miteinander in Verbindung stehenden Nanoporen (10-20 nm) und Makroporen (100-400 µm) (Geistlich Pharma). Das interkonnektierende Porensystem kann das Einwachsen von neuem Knochengewebe fördern, die Oberfläche des Ersatzstoffes wird vollständig davon bedeckt. Das in dieser Untersuchung verwendete bHA-C wird in einem Teilreinigungsprozess bearbeitet, wodurch Nanoporen verschlossen werden; enthalten sind vor allem Makroporen in einer Größe von 150- 600 µm. bHA und eHA werden zunächst in einem identischen Herstellungsverfahren wie eHA-C gewonnen. Anschließend werden ihnen durch schrittweise Erhitzung auf eine Temperatur von 300°C sämtliche organischen Materialien entzogen, so dass die reine mineralische Phase übrig bleibt (Kolk et al. 2012). Durch die schonenden Herstellungs- und Aufarbeitungsprozesse bestehen bHA und eHA aus einem dem natürlichen Knochen ähnlichen weiten Porensystem aus miteinander verbundenen Poren (Peetz et al. 1997). Laut Herstellerangaben ermöglicht die naturbelassene Struktur Gefäßen das Einwachsen in das Konstrukt und fördert die Invasion und Adhäsion von osteogenen Zellen. Im Gegensatz zu den natürlichen Materialien haben synthetische Stoffe wie  $\beta$ -TCP nur wenige interkonnektierende Porensysteme mit einem Porendurchmesser von 100-500 µm (Lian 1995). Eine vollständige Durchdringung des Materials mit neuem Knochengewebe ist so nicht möglich (Schnürer et al. 2003).

Generell vergrößert die Bipolarität der Knochenersatzstoffe, also die Kombination von Nano- und Makroporen, die Oberfläche des Materials; dies ermöglicht die Vaskularisierung und erhöht die Kapillarität bei gleichzeitiger Hydrophilie (Geistlich Pharma). Gute Ergebnisse konnten für eHA-C mit einem bipolaren interkonnektierenden Porensystem erreicht werden. Vergleichsweise schlecht schnitten bHA und eHA ab. Beide Materialien besitzen ein ähnliches Porensystem wie eHA-C, sie unterscheiden sich von eHA-C durch den fehlenden Kollagenanteil. Auch  $\beta$ -TCP und bHA-C besitzen eine vergleichbare Porosität und Porengröße, so lässt sich das bessere Abschneiden ebenfalls durch den Kollagengehalt im bHA-C erklären.



#### 4. Diskussion

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Porosität nur einer der entscheidenden Faktoren für eine erfolgreiche Knochenbildung darstellt.

#### **Keine Knochenbildung ohne MSC**

Als Kontrollgruppe wurden von jedem Knochenersatzmaterial jeweils 4 Konstrukte mit Fibrinkleber angefertigt, die ohne Zellen für 8 Wochen subkutan in SCID-Mäuse implantiert wurden. Für keines der zellfreien Konstrukte konnte nach dieser Zeit Knochenbildung nachgewiesen werden. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein. Beispielsweise konnten van Gaalen et al. an verschiedenen Implantationsstellen (subkutan, intramuskulär oder paraspinal) in zellfreien implantierten Trägermaterialien (HA) im Gegensatz zu zellbesiedelten keine Knochenbildung nachweisen (van Gaalen et al. 2004). Taylor et al. vermuteten zunächst, dass in HA-Keramiken trotz der Erhitzungsprozesse noch für die Knochenbildung verantwortliche organische Substanzen mit osteogenem Potential vorhanden sind (Taylor et al. 2002). Diese These konnte jedoch durch andere Untersuchungen, die eine fehlende Knochenbildung bei alleiniger Implantation von HA-Konstrukten zeigten, nicht bestätigt werden (Tapety et al. 2004). Dies bedeutet also, dass die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche ektope Knochenbildung die simultane Implantation von osteoinduktiven Zellen mit einem geeigneten osteokonduktiven Trägermaterial ist (Rueger 1998, Bareille et al. 2000).

#### **Humane MSC bilden mit allen Materialien ektope Knochen**

Nach subkutaner Transplantation war für alle verwendeten Materialien die Induktion humaner MSC zur Knochenbildung möglich, jedoch mit unterschiedlichem Erfolg. Als Positivkontrolle wurde in dieser Studie phasenreines  $\beta$ -TCP verwendet, da wir mit diesem Material bereits erfolgreich ektope Knochenbildung humaner MSC induzieren konnten, allerdings für nur 69% der untersuchten Spender-MSC-Populationen (Janicki et al. 2010). Dieses Ergebnis konnten wir in der vorliegenden Studie verbessern: mit  $\beta$ -TCP als Trägermaterial

#### 4. Diskussion

konnte bei 89% der Spender-MSK-Populationen Knochenbildung nachgewiesen werden. Letztendlich liegt die Ursache hierfür in einer Optimierung der Methode durch die Erfahrungen vorangegangener Studien. Beispielsweise konnte die Wachstumsgeschwindigkeit der MSK während der Expansion durch eine veränderte Medienzusammensetzung bei der Expansion beschleunigt werden, was die in vivo Knochenbildung letztendlich positiv beeinflusst (Janicki et al. 2010). Nur MSK eines Spenders konnte unabhängig vom eingesetzten Trägermaterial keine Knochenbildung induzieren. In anderen Studien wurde die Ursache einer fehlenden Differenzierungsfähigkeit humaner MSK untersucht. So konnten Stolzing et al. altersabhängige Veränderung humaner MSK beobachten (Stolzing et al. 2008), entsprechend sahen Mendes et al. bei über 51-jährigen Patienten nur für 50% der MSK-Populationen Knochenbildung im ektopen Tiermodell (Mendes et al. 1998). Die MSK, die in der vorliegenden Studie keine Knochenbildung induzierten, stammten von einem 55-jährigen Spender. Jedoch konnten MSK aller weiteren untersuchten Spender in einem Alter von 22-76 Jahren erfolgreich Knochenbildung induzieren. Folglich hatte das Alter in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die in vivo Knochenbildungsfähigkeit humaner MSK.

#### **Biologische Knochenersatzmaterialien vs. Synthetisch**

Von den natürlichen Ersatzmaterialien konnte nur eHA-C entsprechend viele MSK-Populationen zur Knochenbildung anregen wie  $\beta$ -TCP (88%). Das heißt, dass das osteoinduktive Potential humaner MSK auf dem neu entwickelten Knochenersatzstoff ebenso hoch ist wie in der synthetischen Kontrollgruppe. Für bHA war die Knochenbildung mit 33% der Spender-MSK vergleichsweise niedrig. Auch Jaquierey et al. fanden in einer ähnlichen Studie mit bHA nach 8-wöchiger Implantation für nur 39% implantierter MSK/bHA-Konstrukte Knochenneubildung (Jaquierey et al. 2005).



##### **Mehr ektope Knochenbildung humaner MSC mit kollagenhaltigen Materialien**

eHA-C war das einzige biologische Material, das mehr Knochen bildete als die synthetische Vergleichsgruppe. Ebenfalls kollagenhaltiges bHA-C zeigte mit 8,13% mehr Knochen als bHA ( $p=0,027$ ). Statistisch signifikant mehr Knochenfläche/Gesamtkonstrukt konnte für eHA-C (13,36%) im Vergleich zu eHA (3,14%,  $p<0,001$ ) und bHA (1,47%,  $p<0,001$ ) aber nicht zu bHA-C (8,13%) gefunden werden. Da die in vivo Knochenbildung grundsätzlich ein sehr komplexer Prozess ist, kommen für die unterschiedlichen Erfolge verschiedene Ursachen in Frage. Neben dem Typ des Knochenersatzmaterials oder wirtsabhängigen Parametern haben auch implantierte MSC einen signifikanten Einfluss auf die Knochenbildung (Krebsbach et al. 1997, Kuztenov et al. 1997). Entsprechend der Ergebnisse scheint die Härte, die implantierte MSC im kollagenhaltigen Knochenmaterial erfahren, für eine erfolgreiche Anheftung, Proliferation und Migration geeigneter als in reinem HA oder synthetischen Keramiken zu sein. Entscheidend für eine Optimierung der mechanischen Festigkeit von synthetischen Keramiken oder reinem  $\beta$ -TCP und demzufolge der vermehrten Invasion spezifischer und zur Knochenbildung potentiell fähiger Zellen, die zu Osteoblasten differenzieren können, scheint daher der Zusatz von Kollagen zu sein. Dabei spielt für Gleeson et al. das geeignete Verhältnis von Kollagen und Hydroxylapatit eine Rolle (Rueger 1998, Gleeson et al. 2010). Die in dieser Studie verwendeten HA-C-Keramiken sind aus bovinem bzw. equinem Knochen gewonnen und besitzen ein natürliches HA:C-Verhältnis. Die gute Manipulierbarkeit und die guten Resultate lassen vermuten, dass der Zusatz von Kollagen zu HA zumindest keine Nachteile durch Verminderung der Materialsteifheit gegenüber reinem HA bewirkt.

##### **Für keines der implantierten Materialien waren entzündliche Reaktionen nachweisbar**

Die wichtigste Anforderung an einen Knochenersatzstoff ist zunächst die Biokompatibilität (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). So ist sicher gestellt, dass die Implantation nicht zu entzündlichen oder immunologischen Reaktionen führt, was zur Zerstörung oder Abstoßung des Materials führen könnte (Schmidt-Rohlfing et al. 2009, Kolk et al. 2012). Während der 8-wöchigen Implantationszeit konnten bei keinem der Tiere entzündliche Reaktionen wie beispielweise Rötungen oder Ödeme festgestellt werden. Generell besitzen Calcium-Phosphat-Keramiken wie  $\beta$ -TCP oder Hydroxylapatite eine hohe Biokompatibilität ohne immunogene oder toxische Nebenwirkungen (Schnürer et al. 2003, Frauendorf et al. 2007). Die in der vorliegenden Studie zu vergleichenden biologischen Materialien scheinen anhand der Ergebnisse vergleichsweise biokompatibel zu sein. Die fehlenden Entzündungsreaktionen können zusätzlich auf die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC zurückgeführt werden. In den letzten Jahren wurde beobachtet, dass MSC die Immunantwort unterdrücken, indem sie die Reifung von dendritischen Zellen hemmen und die Funktion von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen unterdrücken (Di Nicola et al. 2002, Aggarwal et al. 2005, Zhang et al. 2004, Corcione et al. 2006, Caplan et al. 2010). Fehlende Entzündungsreaktionen auch in Konstrukten, die ohne MSC implantiert wurden, stellen diese Theorie allerdings in den Hintergrund. Demnach scheinen alle verwendeten Knochenersatzstoffe eine den synthetischen Materialien entsprechende Biokompatibilität zu besitzen.

##### **Die Trägermaterialien dienen implantierten MSC als Leitschiene zur Bildung von neuem Knochengewebe**

Für eine erfolgreiche Knochenbildung müssen die Knochenersatzmaterialien den osteogenen Zellen als Leitschiene dienen, entlang der sie in den Defekt einwachsen, zu Osteoblasten differenzieren und letztendlich neue Knochenmatrix aufbauen können (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Calcium-Phosphat-Keramiken

#### 4. Diskussion

wie  $\beta$ -TCP und HA werden besonders wegen ihrer ausgezeichneten Osteokonduktion als Knochenersatzmaterialien verwendet. Werden sie in einen Defekt gesetzt, entwickelt sich ein enger Kontakt zwischen dem Ersatzstoff und neu gebildetem Knochengewebe (Berglundh et al. 2003, Mayfield et al. 2001). Bei Betrachtung der histologischen Schnitte war die neue Knochenmatrix in  $\beta$ -TCP- und HA-Proben vor allem entlang der Oberfläche des Materials zu finden. Große, zusammenhängende Matrices, ausgehend von der Oberfläche des Materials und einwachsend in den Zwischenraum, waren besonders bei kollagenhaltigem eHA-C und bHA-C zu sehen. Auch Gleeson et al. konnten nach Implantation von HA-C-Kompositen in einen im Rattenmandibel gesetzten Defekt kritischer Größe bereits nach 28 Tagen eine nahezu vollständige Überbrückung des Defekts beobachten (Gleeson et al. 2011). Zecha et al. sahen nach lateraler Augmentation des Unterkieferknochens von Ratten mit eHA-C-Konstrukten ein erfolgreiches Knochenwachstum entlang des Materials. Bei Vergleichen der Knochenbildung osteokonduktiver bHA-Konstrukte mit den Ergebnissen für eHA-C konnten diesem Material ebenfalls osteokonduktive Eigenschaften zugeschrieben werden (Zecha et al. 2011).

#### **Der Abbau des Knochenersatzmaterials bietet Platz für Knochenwachstum**

Die Abbaurate des Knochenersatzmaterials sollte in etwa der Wachstumsrate des neuen Knochengewebes entsprechen. Wünschenswert ist der vollständige Abbau des Materials zum Zeitpunkt der Geweberekonstruktion, das zuvor eine „Platzhalterfunktion“ hat (Kamitakahara et al. 2008, Schmidt-Rohlfing et al. 2009).  $\beta$ -TCP wird bereits innerhalb weniger Monate resorbiert, gleichzeitig hat sich meist schon neuer Knochen gebildet. Grund dafür ist die homogene Struktur von  $\beta$ -TCP, die nach Implantation einen engen Kontakt zum Gewebe erlaubt und eine rasche Vaskularisierung ermöglicht; dies bietet optimale Bedingungen zum Aufbau von neuem Knochengewebe (Kolk et al. 2012). Rueger sah allerdings eine Limitierung für die klinische Verwendung von  $\beta$ -TCP in einem zu schnellen Abbau der Keramik. Dies kann zu einer Entzündung mit anschließender Bindegewebsbildung und schließlich zu mangelnder Knochenneubildung führen (Rueger 1998).

#### 4. Diskussion

Hydroxylapatite hingegen werden nur sehr langsam abgebaut, die Resorptionsrate ist so gering, dass das Material noch lange nach der Implantation im Körper verbleibt (Schnürer et al. 2003, Rokn et al. 2011). In der vorliegenden Studie kann der langsame Abbau von HA eine Ursache für den geringeren Anteil neuer Knochenfläche am Gesamtkonstrukt sein. In gefärbten Schnitten der bHA/MSC- und eHA/MSC-Konstrukte war der neue Knochen nur an der Oberfläche des Materials und lediglich bis in die Poren des Trägers vorgedrungen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Jaquiéry et al., auch sie konnten nach subkutaner Implantation für HA/MSC-Konstrukte weniger Knochen finden als für TCP/MSC-Konstrukte (Jaquiéry et al. 2005). Sie sahen nach 8 Wochen eine vernachlässigbar geringe Resorption des HA und deuten dies als Ursache für die geringe Knochenbildung, da dem neuen Gewebe weniger Platz zur Verfügung stand (Jaquiéry et al. 2005). Kollagen wird schnell abgebaut und vom Körper resorbiert (Wahl et al. 2006). Als Bestandteil von kombinierten Ersatzmaterialien erhöht es die Resorptionsrate der Implantate (Penaud 1992) Johnson et al. konnten den Abbau für HA-C-Komposite bereits innerhalb von 2-12 Monaten beobachten (Johnson et al. 1996). Möglicherweise wird Kollagen in geeigneter Geschwindigkeit resorbiert, so dass sich neues Knochengewebe entlang des langsamer resorbierten HA entwickeln kann und genug Fläche zur Ausbreitung findet. Leider konnte die Resorptionsrate der Knochenersatzstoffe in der vorliegenden Studie nicht genauer untersucht werden. Die Materialien haben eine dem natürlichen Knochengewebe gleichende Röntgendichtigkeit und lassen sich daher im Mikro-Computertomograph nicht von dem neu entstandenen Knochen differenzieren.

#### **Rolle der Mikroumgebung für die Knochenbildung**

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie wurde bHA in anderen Studien als besonders biokompatibles Material mit einem guten Potential zur Knochenbildung beschrieben. Außerdem wird es zur Rekonstruktion von kleinen Knochendefekten bereits bei zahlreichen Indikationen erfolgreich klinisch eingesetzt (Hallfeldt et al. 1994, Zecha et al. 2011, Scabbia et al. 2004, Rokn et al.

#### 4. Diskussion

2011). Auch Tapety et al. konnten nach Implantation von bHA-Konstrukten in Rattenoberschenkelknochen in gesetzten Defekten kritischer Größe bereits in der Initialphase der Rekonstruktion deutliche Knochenbildung nachweisen (Tapety et al. 2004, Gutwald et al. 2010). Allerdings sind die Bedingungen für die Osteogenese im subkutanen Implantationsmodell anders als im orthotopen Modell. Die Zellen müssen zunächst animiert werden, aus dem Fibringemisch zu den Knochenersatzstoffen auszuwandern, sich niederzulassen, zu proliferieren, zu Osteoblasten zu differenzieren um schließlich neues Knochengewebe zu bilden (Kubler et al. 1999). Die erfolgreiche Differenzierung implantierter MSC zu knochenbildenden Zellen gelingt im ektopen Tiermodell nur dann, wenn das Trägermaterial den Zellen die geeignete Mikroumgebung bietet. Faktoren wie die mechanische Stabilität, die Partikelgröße, die Porengröße, die Interkonnektivität und die Resorptionsrate des Ersatzstoffes sind dafür in diesem Modell besonders entscheidend (Muraglia et al. 1998, Mankani et al. 2001, Gleeson et al. 2011). Schließlich ist die Durchblutung im ektopen Implantationsbett geringer, was die Osteogenese zusätzlich erschwert und die Zellen zunächst extremen Bedingungen aussetzt. Anhand der Ergebnisse scheint der Zusatz von Kollagen zu HA die notwendige Mikroumgebung zu liefern, die sogar unter extremen Bedingungen eine erfolgreiche osteogene Differenzierung humaner MSC ermöglicht. Des Weiteren kommt es nach Implantation in einen gesetzten Defekt an orthotoper Stelle zur Freisetzung und Akkumulation von Wachstumsfaktoren, die vorher in der Knochenmatrix des Wirtstieres eingebettet waren und für die Osteogenese verantwortlich sind (Tapetiy et al. 2004). An ektooper Implantationsstelle fehlen diese Faktoren; da Kollagen erfolgreich als Lieferant für Wachstumsfaktoren eingesetzt wird, kann deren Mangel an ektooper Stelle durch Kollagen ausgeglichen werden (Li 1996).

##### **Neuer Knochen entsteht durch humane MSC**

Die Überprüfung, ob neues Knochengewebe durch die Tätigkeit implantierter humaner MSC oder eingewanderter und zu Osteoblasten differenzierter muriner Zellen gebildet wurde, erfolgte mittels in situ Hybridisierung ausgewählter Gewebeschnitte mit Maus-spezifischen SINEB1/B2-Sonden (Steck et al., 2010) und human-spezifischen ALU-Sonden (Kasten et al. 2006). In den gefärbten Schnitten konnten für alle Knochenersatzmaterial/MSC-Konstrukte humane Zellen im neuen Knochengewebe eindeutig identifiziert werden. Sie waren angelagert an die Matrix des neuen Knochens und fanden sich auch zahlreich im Bindegewebe. Die Detektion murin-spezifischer DNA-Sequenzen zeigte im Gegensatz dazu positive Signale vor allem im Bindegewebe in der Peripherie des neu gebildeten Knochengewebes. Zusammengefasst bedeutet dies, dass Knochen durch implantierte humane MSC und nicht durch aktivierte und zu Osteoblasten differenzierte murine MSC gebildet wurde (Bareille et al. 2000, Steck et al. 2010). Auch Bareille et al. konnten nach subkutaner Implantation von HA/MSC-Konstrukten im neu entstandenen Knochengewebe ausschließlich humane DNA nachweisen (Bareille et al. 2000). Eine besonders hohe Zelldichte war in Schnitten mit starker Knochenbildung zu finden, dies gilt als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Osteogenese (Friedenstein et al. 1966). Dies entspricht unseren Daten, die zeigen, dass in Schnitten mit geringer Knochenbildung nach Alu in situ-Hybridisierung weniger positive Signale als in Schnitten mit viel Knochenbildung zu finden waren. Möglicherweise sind implantierte MSC, die nicht in der Lage waren Knochen zu bilden, von der Implantationsstelle migriert oder abgestorben. Generell ist es neben dem Überleben implantierter Zellen auch entscheidend, dass sie nicht in andere Organe wandern und dort unerwünschtes Wachstum auslösen bzw. zur Knochenbildung nicht mehr zur Verfügung stehen. Schieker et al. haben deswegen nach ektoper Transplantation humaner MSC-Knochenersatzstoff-Konstrukte in immundefizienten Mäusen die Migration bzw. Integration der Zellen untersucht. Mittels PCR konnten sie im Gegensatz zu Blut und Organen humane DNA in besiedelten Leitschienen nachweisen. Letztendlich zeigten humane MSC nach subkutaner Implantation mit Trägermaterialien eine gute Integration im Implantationslager, eine Migration konnte nach diesen

#### 4. Diskussion

Untersuchungen ausgeschlossen werden (Schieker et al. 2004) und ist auch in der vorliegenden Studie vermutlich nicht die Ursache für die teilweise geringere Zelldichte. Wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben sind MSC nur in geeigneter Mikroumgebung in der Lage zu adhären, proliferieren und zu Osteoblasten zu differenzieren (Rueger 1998). Die Mikroumgebung im ektopen HA-Implantationsbett scheint für die implantierten humanen MSC nicht optimal zu sein. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Kasten et al., die in explantierten HA-Konstrukten eine geringere Zelldichte fanden als in einer Vergleichsgruppe mit  $\beta$ -TCP (Kasten et al. 2005). Rodrigues et al. untersuchten massenspektrometrisch die Bindung humaner Osteoblasten an bHA-C-Keramiken. Die Zellen adhärten sowohl an HA-Partikel als auch an Kollagenfasern, durch die sie durch benachbarte Partikel in das Innere des Komposits geleitet wurden. In HA/C-Proben konnte im Gegensatz zu HA-Proben eine homogene Verteilung der implantierten humanen MSC gefunden werden (Rodrigues et al. 2003). In allen untersuchten Schnitten der vorliegenden Studie konnten humane MSC in der neuen Knochenmatrix und im Bindegewebe nachgewiesen werden, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Da besonders viele Zellen in Schnitten der kollagenhaltigen Proben zu finden waren, scheint der Zusatz von Kollagen die Anlagerung und Proliferation implantierter Zellen positiv zu stimulieren und den Zellen eine geeignete Mikroumgebung zu bieten. So haben auch Wahl et al. beschrieben, dass die Oberfläche des Kollagens so beschaffen ist, dass sich implantierte Zellen gut anheften können (Wahl et al. 2006).

#### **Die Herkunft des Knochenersatzmaterials hat keinen Einfluss auf die Knochenbildung**

In der vorliegenden Untersuchung lieferten vergleichbare Knochenersatzmaterialien aus Rinder- bzw. Pferdeknochen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die gebildete Knochenmenge. Jedoch könnte die geringere Akzeptanz des Patienten aus Angst vor Übertragung einer Prionenerkrankung durch bovine Knochenersatzmaterialien zugunsten von Materialien nicht-bovinen Ursprungs ausfallen. Zwar konnte laut



#### 4. Diskussion

Herstellerangaben für bHA der Nachweis erbracht werden, dass die Bedingungen zur Inaktivierung des BSE-Erregers bei der Herstellung gegeben sind. Das Produkt hat dafür 2004 ein Zusatzzertifikat zur Bescheinigung der Unbedenklichkeit in Bezug auf das Übertragungsrisiko einer spongiformen Enzephalopathie erhalten. Jedoch konnten in anderen Studien in bovinen Knochenersatzmaterialien Proteinstrukturen nachgewiesen werden (Hoenig et al. 1999, Institut Fresenius 2000). Obwohl kein direkter Nachweis für Prionen in der Knochenmatrix erfolgte, kann das Restrisiko der Übertragung nicht ganz ausgeschlossen werden (Hausschild et al. 2004). Schließlich gelangen diese kontroversen Diskussionen an die Patienten und könnten durch den Einsatz natürlicher Materialien anderer Spezies, z.B. Pferd, oder vollsynthetischer Materialien zu einer besseren Akzeptanz führen.

#### **Kollagen als vielversprechender Bestandteil in Knochenersatzmaterialien**

Kollagen hat exzellente biokompatible Eigenschaften, wird rasch abgebaut und vom Körper resorbiert; Nachteil ist die im Vergleich zu Knochen relativ geringe mechanische Stabilität (Wahl et al. 2006). Die Kombination von Kollagen mit mechanisch stabilen Calciumphosphaten wie HA oder  $\beta$ -TCP soll diesen Nachteil ausgleichen und die Frakturstabilität erhöhen (Yamauchi et al. 2004). Kombinationen von osteokondktivem  $\beta$ -TCP mit osteoinduktivem, porösem Kollagen wurden als vielversprechende Komposite untersucht (Zou et al. 2004). Allerdings werden beide Ausgangssubstanzen schnell abgebaut (Rueger 1998). Für eine erfolgreiche Osteogenese sollte die Struktur des Trägermaterials jedoch bis zur Rekonstruktion des neuen Gewebes aufrechterhalten werden (Engler et al. 2004, 2006). Da HA nur sehr langsam abgebaut wird (Kolk et al. 2012), ebenfalls mechanisch stabil ist und gute osteokondktive Eigenschaften besitzt (Gleeson et al. 2011), scheint die Kombination von HA mit schneller resorbierbarem Kollagen zur Einleitung von regenerativen Prozessen in Knochendefekten sinnvoll (Wahl et al. 2006). Sowohl Kollagen Typ 1 als auch HA erhöhen als Einzelsubstanzen die Differenzierung von Osteoblasten; werden sie kombiniert eingesetzt, sollen sie die Osteogenese beschleunigen (Xie et al. 2004). In der vorliegenden Studie konnte



#### 4. Diskussion

nach 8 Wochen in vivo Kultivierung der HA-C-Konstrukte in Kombination mit MSC mehr Knochen gefunden werden als in reinen HA-Proben. Auch Zecha et al. konnten für reine HA-Keramiken nach lateraler Augmentation von Rattenmandibeln in einem Zeitraum von 3 Monaten weniger neues Knochengewebe nachweisen als für die eHA-C Vergleichsgruppe. Sie begründen dies mit einer zu kurzen Heilungsphase und diskutieren, dass eine Verlängerung auf 6-12 Monate für eine ausreichende Knochenbildung für dieses Material notwendig sei (Zecha et al. 2011).

In zahlreichen weiteren Studien wurden HA/C-Komposite als potentielle Ersatzmaterialien zur Regeneration von Knochengewebe untersucht (Swetha et al. 2010). Allerdings zeigten diese Versuche nach guten in vitro Ergebnissen nur limitierten klinischen Erfolg (Ilán et al. 2003, Barrere et al. 2003, Carter et al. 2009). Gleeson et al. sehen die Ursache für den Misserfolg der in vivo Studien in einer unzureichenden Durchblutung. Die Nährstoffe gelangen nicht in das Innere der Konstrukte, während Abbauprodukte nicht abtransportiert werden können. Weitere Schwierigkeiten sehen sie in der Herstellung der Komposite, da hierbei vor allem die homogene Verteilung der beiden Phasen wichtig ist (Gleeson et al. 2010). Die in der vorliegenden Studie verwendeten HA-C-Keramiken werden aus natürlichem Knochen gewonnen. Die Besonderheit des neu entwickelten Knochenersatzstoffes eHA-C liegt im schonenden Herstellungsprozess begründet. Dieser ermöglicht den Erhalt der natürlichen Knochenstruktur. So ist eine homogene Verteilung der beiden Phasen (HA und Kollagen) gegeben, außerdem kann eine hohe Porosität in Kombination mit hoher mechanischer Stabilität und hoher Permeabilität erreicht werden. Durch den natürlichen Erhalt des Kollagens soll vor allem das Einwachsen von neuem Knochengewebe beschleunigt werden (Zecha et al. 2011). eHA-C besitzt ein Netzwerk aus Nano- und Makroporen, die schwammartig miteinander in Verbindung stehen. Daher besitzt eHA-C eine große Aufnahmekapazität für Blut, Proteine, Wachstumsfaktoren und optimale Bedingungen für das Einwachsen von neuem Knochengewebe und Blutgefäßen. Diese Eigenschaften machen eHA-C zu einem interessanten Material für den zukünftigen Einsatz als Trägermaterial im Rahmen des Tissue Engineering.

##### **Limitierung der Studie**

Tissue Engineering-Verfahren zur Regeneration von Knochenbrüchen benötigen MSC, die in Kombination mit Knochenersatzmaterialien nach der Transplantation im Stande sind, das Gewebe zu regenerieren und zu erneuern. Die sogenannte Spendervariabilität in der osteogenen Differenzierungskapazität humaner MSC ist einer der limitierenden Faktoren für eine optimale Heilung. In bereits abgeschlossenen Studien in unserem Labor konnte die ektope Knochenbildung humaner MSC auf synthetischen  $\beta$ -TCP-Konstrukten nur für ca. 69% der Spender Populationen beobachtet werden (Janicki et al. 2010). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Ergebnis zu verbessern und MSC aller untersuchten Spender zur Knochenbildung anzuregen. Mit 88% konnten wir dieses Ergebnis mit dem biologischen Knochenersatzstoff eHA-C und ebenfalls mit  $\beta$ -TCP zwar verbessern, aber das Problem der Spendervariabilität nicht vollständig lösen. Neben den bereits diskutierten Problemen, die einen nachhaltigen Einfluss auf die ektope Knochenbildung humaner MSC in vivo haben, gibt es noch weitere Faktoren, die den Erfolg beeinflussen könnten. Beispielsweise könnten Vorerkrankungen der Spender die ektope Knochenbildungsfähigkeit seiner MSC limitieren. Einige MSC stammten von Spendern mit Vorerkrankungen wie beispielsweise Arthrose, Pseudarthrose oder Osteochondrose. Die Auswirkung auf die Knochenbildung konnte jedoch aufgrund der Vielfalt der Erkrankungen nicht ermittelt werden. Da mit hoher Wahrscheinlichkeit gerade diese Patienten von einer regenerativen Knochentherapie profitieren, wurden diese bewusst nicht aus der Studie ausgeschlossen. Für die genaue Ermittlung der Mechanismen, die für eine fehlende Knochenbildung humaner MSC in Frage kommen, sollten jedoch besser Proben von ausschließlich gesunden Spendern untersucht werden. Ein weiterer Aspekt, der nicht standardisiert werden konnte, ist die Tatsache, dass die Entnahme des Knochenmarks durch unterschiedliche Chirurgen erfolgte. Als weiteren limitierenden Faktor stellte sich zu Beginn der Studie, die Standardisierung der Größe der Knochenersatzmaterial/MSK-Konstrukte heraus. Während es gelang alle Materialien auf eine einheitliche Granulatgröße zu bringen und sie mit der gleichen Zellzahl zu besiedeln blieb materialbedingt als variabel

Faktor jedoch die Größe der Implantate. Sind ektope Konstrukte zu groß, kann die Blutversorgung unzureichend sein (Kaully et al. 2009). Insgesamt waren die Konstrukte der kollagenhaltigen Knochenersatzmaterialien makroskopisch etwas kleiner als die der kollagenfreien und synthetischen Vergleichsgruppen. Schließlich konnten wir für diese kleineren, kollagenhaltigen Knochenersatzstoffe günstigere Ergebnisse beobachten. Daher ist nicht auszuschließen, dass die etwas geringere Größe der Konstrukte in den Knochenbildenden Gruppen einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

## **Fazit**

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden erstmalig biologische Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft mit synthetischem  $\beta$ -TCP im Tiermodell hinsichtlich der ektope Knochenbildung gleicher humaner MSC Populationen miteinander verglichen. Durch Standardisierung aller Materialien, konnten im ektope Tiermodell, und damit in großer Nähe zur klinischen Anwendung, aussagekräftige Vorhersagen für die Verwendung der Materialien in Kombination mit MSC im Rahmen des Tissue Engineering getroffen werden. Während Unterschiede aufgrund der Herkunft (bovin, equin, synthetisch) kaum ins Gewicht fallen, schien der Gehalt an Kollagen einen entscheidenden Einfluss zu haben. Dabei zeigten MSC auf dem neu entwickelten Knochenersatzstoff eHA-C am meisten neu gebildeten Knochen und dieser natürliche Knochenersatzstoff war der einzige, der der synthetischen Vergleichsgruppe  $\beta$ -TCP überlegen war. Letztendlich konnte dadurch das Problem der Spendervariabilität zwar nicht vollständig gelöst werden. Anhand der guten Ergebnisse für eHA-C in der vorliegenden Studie scheint dessen künftiger klinischer Einsatz aber sehr aussichtsreich. Weitere Untersuchungen sollten aber als nächsten Schritt das Verhalten von MSC/eHA-C Implantaten in einem Knochendefekt prüfen, um zu beurteilen, wie sich das Material im Zielgewebe verhält.

## 5. Zusammenfassung

Die Standardbehandlung von Knochendefekten besteht aus dem Ersatz des fehlenden Knochens durch autologe Spongiosa, Probleme sind die begleitende Patientenmorbidity und die limitierte Verfügbarkeit. Eine mögliche Alternative stellen Tissue Engineering Verfahren dar, bei denen die Defektstelle mit Hilfe von Knochenersatzstoffen und Mesenchymalen Stammzellen (MSC) rekonstruiert wird. Synthetische Ersatzstoffe wie  $\beta$ -TCP sind aufgrund ihrer unbegrenzten Verfügbarkeit und osteokonduktiven sowie biokompatiblen Eigenschaften attraktiv, allerdings konnten sie in vorangegangenen Studien im ektopen Tiermodell nur mit 69 % der untersuchten Spender-MSC-Populationen Knochen bilden. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit erfolgte der Vergleich der ektopen Knochenbildung humaner MSC auf natürlichen Knochenersatzstoffen mit synthetischem  $\beta$ -TCP. Außerdem wurden die Auswirkungen von Kollagen als Bestandteil von Knochenersatzstoffen auf die ektopische Knochenbildung untersucht. Zunächst konnten wir in vitro die Multipotenz der untersuchten MSC Populationen bestätigen. In vivo verglichen wir zwei equine und zwei bovine Knochenersatzmaterialien, je eines mit Kollagen (eHA-C, bHA-C) und eines ohne (eHA, bHA) mit synthetischem  $\beta$ -TCP. Granulate in standardisierter Partikelgröße wurden mit MSC von 9 Spendern besiedelt und subkutan in SCID Mäuse transplantiert. Die ektopische Knochenbildung wurde nach 8 Wochen histomorphometrisch beurteilt. Mittels in Situ-Hybridisierung mit human- und murin spezifischen DNA Sonden wurde die Herkunft des neuen Knochengewebes bestimmt. Wir konnten nachweisen, dass neuer Knochen durch implantierte humane MSC gebildet wurde und nicht durch eingewanderte Wirtszellen. Mit Ausnahme eines Spenders, der mit keinem Knochenersatzmaterial neues Knochengewebe bildete, konnte Knochenneubildung mit eHA-C und  $\beta$ -TCP für die MSC aller Spender detektiert werden. Die höchste mittlere Knochenmenge/Gesamtkonstrukt war für eHA-C zu verzeichnen. Dieser war signifikant höher als mit  $\beta$ -TCP, kollagenfreiem eHA und bHA. Signifikant mehr Knochen konnten wir außerdem für bHA-C im Vergleich zu kollagenfreiem bHA finden. Nur eHA-C war signifikant besser als synthetisches  $\beta$ -TCP. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Kollagen als Bestandteil von Knochenersatzmaterialien günstig

für eine vermehrte Knochenablagerung darstellt. Es bietet implantierten MSC die passende Umgebung zur Adhäsion, Proliferation und letztendlich zur Entwicklung von neuem Knochengewebe. Obwohl das Problem der Spendervariabilität auch mit eHA-C nicht vollständig gelöst werden konnte, scheint dessen klinischer Einsatz sehr aussichtsreich.

## 6. Summary

Large non-healing bone defects represent a challenge to regenerative medicine. To tackle this challenge, the combination of bone replacement materials and human mesenchymal stem cells (MSC) present a promising approach. Nevertheless, none of the bone substitute materials currently in clinical use satisfies the expectations on a perfect material for bone regeneration. Aim of our study was to find the biomaterial that reproducibly induces robust ectopic bone formation in human MSC. The multilineage differentiation potential of donor MSC was assessed by chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation in vitro. Subsequently, 5 different biomaterials were seeded with MSC from 9 donors in duplicates and transplanted subcutaneously into SCID mice, to evaluate ectopic bone formation. After 8 weeks, explants were evaluated by histology and the average percentage of newly deposited bone was determined by histomorphometry. To assess the origin of new built tissue, in situ hybridisation was applied on histological sections. Multilineage potential of donor MSC was corroborated by positive collagen II staining after chondrogenic induction, an increased alkaline phosphatase activity as well as increased mineralisation corroborated the osteogenic differentiated potential and oil red positive droplets confirmed adipogenic differentiation. Evaluation of in vivo ectopic bone formation resulted in the highest number of constructs with bone deposition for  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) and equine hydroxyapatite with collagen (eHAC), followed by bovine hydroxyapatite with collagen (bHA-C) and equine hydroxyapatite without collagen (eHA). The lowest bone positive construct number reached deproteinized bovine spongiosa (bHA) tested. Histomorphometric analyses revealed higher de novo bone formation on bHA-C compared to bHA. Strikingly, eHAC deposited significantly more bone compared to bHA, eHA and  $\beta$ -TCP and showed a higher tendency of bone formation than bHA-C. In situ hybridisation confirmed the human origin of the newly formed bone. Our data provide evidence that eHAC showed a reproducibly superior osteo-inductivity on human MSC compared to the other materials tested.

## 6. Summary

Furthermore, collagen seemed to markedly improve bone formation on eHA and thus might represent a potent additive for bone substitute material. Further studies will follow to confirm the here suggested potential of eHAC.

## 7. Literatur

**Agata H**, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S (2010): Donor variation and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Eng*; 16:663-73

**Aggarwal S**, Pittenger MF (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*; 105: 1815-1822

**Albrektsson T**, Branemark PI, Hansson HA, Lindström J (1981): Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring long-lasting, direct bone anchorage in man. *Acta Orthop Scand*; 52: 155-70

**Anderegg CR**, Alexander DC, Freidmann M (1999): A bioactive glass particulate in the treatment of molar furcation invasions. *Journal of Periodontology*; 70: 384-7

**Bareille R**, Lafage- Proust MH, Fauchoux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amédée J (2000): Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extraosseous site. *Biomaterials*; 21: 1345-1352

**Barrere F**, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K, Larolle P (2003): Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A*; 66: 779- 788

**Bauer T**, Muschler G (2000): Bone graft materials, an overview of the basic science. *Clinical orthopaedics and related research*; 371: 10-27

**Berglundh T**, Abrahamsson I, Lang N, Lindhe J (2003): De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research*; 14: 265-271

**Berry CC**, Campbell G, Spadicino A, Robertson M, Curtis AS (2004): The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. *Biomaterials*; 25: 5781-5788

**Bianco P**, Robey PG (2001): Stem cells in tissue engineering. *Nature*; 414: 118-121

**Bonfield TL**, Caplan AI (2010): Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases. *Discov. Med*; 9: 337-45

**Bosma GC**, Custer RP, Bosma MJA (1983): Severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*; 301: 527-30

**Bruder SP**, Fox B (1999): Tissue Engineering of bone. *Clin Orthop Relat Res*; 367: 68-63

**Buchholz RW**, Carlton A, Holmes RE (1987): Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*; 18: 323-34



## 7. Literatur

**Byrne EM**, Farrell E, McMahon LA, Haugh MG (2008): Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen- glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation. *J Mater Sci Mater Med*; 19: 3455- 3463

**Carter JD**, Swearingen AB, Chaput CD, Rahm, MD (2009): Clinical and radiographic assessment of transforaminal lumbar interbody fusion using HEALOS collagen-hydroxyapatite sponge with Autologous bone marrow aspirate; *Spine J*; 9: 434-438

**Choi S**, Jang Y, Choi J, Jeong J, Kwon T (2011): Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes, *Clin Oral Implant Res*; 1-7

**Caplan AI**, Bruder SP (2001): Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*; 7: 259-64

**Corcione A**, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006): Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*; 107: 367-372

**De Boer FC**, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarmann HJ (2003): Healing of segmental bone defect with granular porous hydroxyapatite augmented with the recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*; 21: 521-8

**Di Nicola M**, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*; 99: 3838-3843

**Dominici M**, Le Blanc K, Mueller I, Slaper- Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement, Position Paper. *Cytotherapy*; 8: 315-317

**Ducheyne P**, Radin S, King L (1993): The effect of calcium phosphate ceramics composition and structure on in vitro behaviour 1. Dissolution, *J Biomed Mater Res*; 27: 25-34

**Engler AJ**, Richert L, Wong JY, Picart C, Discher DE (2004): Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf Sci*; 570: 142-154

**Engler AJ**, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006): Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*; 126:677-689

**Epple M**, Bäuerlein E (2007): □Handbook of Biomineralization - Medical and Clinical Aspects. Wiley Vch: 81-95

**Frauendorf T**, Süming W (2007): Knochenersatz in der zahnärztlichen Chirurgie. *Implantologie Journal*; 4:6-11

**Freyman TM**, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ (2001): Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials*; 22: 2883-91

**Friedenstein AJ**, Piatetzky- Shapiro II, Petrakova KV (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morph*; 16: 581-390

**Friedenstein AJ**, Petrakova KV, Kurolesova AI (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*; 6: 230-247

**Friedenstein AJ**, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA (1974): Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.*;2: 83-92

**Frost HM** (1989): The biology of fracture healing. An overview for clinicians, part 2. *Clin Orthop Rel Res*; 248: 294-309

**Gebhart M**, Lane J (1991): A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta orthopaedica belgica*; 57: 130-43

**Gleeson JP**, Plunkett NA, O'Brien FJ (2010): Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *European cells and materials*; 20: 218-230

**Gleeson JP**, O'Brien FJ (2011): Composite Scaffolds for Orthopaedic Regenerative Medicine, *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology*, Dr. Brahim Attaf (Ed.), ISBN: 978-953- 307-235-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-composite-materials-for-medicine-and-nanotechnology/composite-scaffolds-for-orthopaedic-regenerative-medicine>

**Gronthos S**, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:13625-30

**Gronthos S**, Zannettino A, Hay S, Shi S, Graves S (2003): Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.*;116: 1827- 1835

**Groebeiner M**, David R, Franz WM (2006): Embryonale Stammzellen, Zukünftige Möglichkeiten. *Der Internist*; 5: 502-508

**Gutwald R**, Haberstroh J, Kuschnierz J, Kister C, Lysek D A, Maglione M, Xavier S P, Oshima T, Schmelzeisen R, Sauerbier S (2010): Mesenchymal stem cells

## 7. Literatur

and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 48: 285-90

**Hallfeldt KK**, Stützel H, Puhlmann M, Bulut N, Kessler S, Schweiberer L (1994): Bridging long tibial shaft defects by partially demineralized bone matrix. *Unfallchirurg*; 97: 518-24

**Handscheil J**, Simnowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, Kubler NA (2009): A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Med*; 5: 12

**Haynesworth SE**, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*; 13: 81-8

**Hauschild G**, Bader A (2004): Vor- und Nachteile synthetischer versus xenogener Knochenersatzmaterialien. *Tierärztl Praxis*; 32:67-70

**Hench LL** (1998): Bioceramics. *J. Amer. Ceram. Soc*; 81: 1705-28

**Hench LL**, Wilson J (1993): An Introduction to bioceramics; Advanced Series in Ceramics. World Scientific: 41-62

**Hertz A**, Bruce I (2007): Inorganic materials for bone repair or replacement applications. *Nanomedicine*; 2: 899-918

**Hing, K.A.** (2005): Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*; 2: 184-199

**Hodgkinson T**, Yuan XF, Bayat A (2009): Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*; 6: 621-640

**Hoening JF**, Merten HA, Heinemann DE (1999); Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plast Reconstr Surg*; 103: 1324-5

**Hutmacher DW** (2000): Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*; 21: 2529-43

**Ilan DI**, Ladd AL (2003): Bone graft substitutes. *Oper Techn Plas Recon Surg*; 9: 151-160

**Institut Fresenius**, Taunusstein, Bestimmung von Stickstoff und Kohlenstoff in einem Knochenmaterial. 21.09.2000, Auftragsnummer 100/18622-00

**Janicki P**, Kasten P, Kleinschmidt K, Luginbuehl R, Richter W (2010): Chondrogenic pre-induction of human mesenchymal stem cells on  $\beta$ -TCP: Enhanced bone quality by enchondral heterotopic bone formation. *Acta biomaterialia*; 6: 3292-3301

**Janicki P**, Boeuf S, Steck E, Egermann M, Kasten P, Richter W (2011): Prediction of in vivo bone forming potency of bone marrow-derived human mesenchymal

## 7. Literatur

stem cells. *European Cells and Materials*; 21: 488-507

**Jaquiere C**, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer H F, Heberer M, Martin I (2005): In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann Surg*; 242: 859-67

**Jensen Y**, Jahagirdar B N, Hjorting- Hansen E, Schenk R, Buser D (2006): Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*; 17: 237-243

**Johnson KD**, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwkh J, Meyers L, Scidini MF (1996): Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological, and radiographic analysis. *Journal of Orthopaedic Research* ; 14: 351-369

**Kamitakahara M**, Ohtsuki C, Miyazaki T (2008): Review paper: Behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *Journal of biomaterial application*; 23: 197-212

**Kasten P**, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Böhner M, Richter W (2008): Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* ; 4:1904-15

**Kasten P**, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, Kramer M, Leo A, Richter W (2006): Influence of platelet- rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs*; 183: 68-79

**Kasten P**, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, Helbig L, Weiss S, Fellenberg J, Leo A, Simank H G, Richter W (2005): Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* ; 26: 5879-5889

**Kasten P**, Luginbühl R, Vogel J, Niemeyer P, Weiss S, van Griensven M, Krettek C, Böhner M, Bosch U, Tonak M (2004): Induction of bone tissue on different biomaterials: An in vitro and a pilot in vivo study in the SCID Mouse. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*; 2004142: 467-75

**Kaullly T**, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S (2009): Vascularization-the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev*; 15: 159-169

**Khan SP**, Tomin E, Lane JM (2000): Clinical application of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*; 31: 389-98

**Ko HCH**, Milthorpe BK, McFarland CD (1997): Engineering thick tissue- the vascularisation problem, *eCells & Materials Journal*; 14: 1-19

- Kolk A**, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R (2012); Current trends and future perspectives of bone substitute materials- From space holders to innovative biomaterials. Journal of Cranio- Maxillo- Facial Surgery; 1-13
- Krebsbach P**, Kuznetsov S, Satomura K, Emmons R, Rowe D, Robey P (1997): Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. Transplantation ; 63 : 1059-1069
- Kruyt MC**, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004): Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. J Orthop Res;22: 544-551
- Kubler NR**, Will C, Depprich R, Betz T, Reinhart E, Bill JS, Reuther JF (1999): Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogeneic bone tissue. Mund Kiefer Gesichtschir; 3: 53-60.
- Kutscher** (2008): Erhebung zur Entwicklung und aktuellen Situation allogener Knochenbanken in Deutschland <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2009/0561/>
- Kuznetsov SA**, Krebsbach PH, Satomura K (1997): Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. J Bone Miner Res; 12: 1335–1347
- Kuznetsov SA**, Mankani MH, Robey PG (2000): Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. Transplantation; 70: 1780-1787
- Li ST** (1996): Collagen as a delivery vehicle for bone morphogenetic protein (BMP). Tran. Orthop. Res. Soc; 21: 647-650
- Langer R**, Vacanti JP (1993); Tissue engineering. Science; 260:920
- Laurencin C**, Khan Y, El-Amin S (2006): Bone graft substitutes. Expert Rev Med Devices; 3: 49-57
- Loveridge N** (1999); Bone: more than a stick. J Anim Sci; 77: 2190-196.
- Lüllmann-Rauch** (2006): Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschlagen; Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage
- Mankani MH**, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG (2001): In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. Biotechnol. Bioeng; 72: 96- 107
- Mayfield LJ**, Skoglund A, Hising P, Lang NP, Attström R (2001): Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. Clin Oral Implants Res; 12: 508–514
- Mendes SC**, van den Brink I, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA (1998): In vivo bone formation by human bone marrow cells: Effect of osteogenetic culture supplements and cell densities. J. Mater. Sci. Mater.Med; 9: 855-858

**Mendes SC**, Tibbe JM, Veenhof M, Both S, Oner FC, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD (2004). Relation between in vitro and in vivo osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*; 15: 1123-1128

**Meyer S**, Floerkemeier T, Windhagen H (2007): Histological osseointegration of Tutobone<sup>®</sup>: first results in human. *Arch Orthop Trauma Surg*; 128 : 539-544

**Muraglia A**, Martin L, Cancedda R, Quarto R, (1998): A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions; *Bone* ;22: 131-134

**Murphy CM**, Haugh MG, O'Brien FJ (2010): The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*; 31: 461-466

**Niedhart C**, Niethard FU (1998): Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. Puhl W (Hrsg): *Bioceramics in Orthopaedics - New Applications*, Ferdinand Enke, Stuttgart; 46-50

**O'Brien FJ**, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ (2005): The effect of pore size on cell adhesion in collagen- GAG- scaffolds. *Biomaterials*; 26: 433-441

**Peetz M** (1997): Characterization of xenogenic bone material, In: Boyne PJ: *Osseous reconstruction of the maxilla and the mandibel - surgical techniques using titanium mesh and bone mineral*. Chicago, Berlin: Quintessence; 87-100

**Penaud J**, Martin G, Membre H, Miller N, Merle M, Mahler C, Mole C (1992): Influence d'une membrane de collagene experimentale dans un protocole de reparation de l'attache. *Journal de Paradontologie*; 11: 45-60

**Perry Clayton R** (1999): *Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft Substitutes*. Clin Orthop Relat Res; 360:71-86

**Petite H**, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000): Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* ; 18: 959-963

**Phelps EA**, Landazuri N, Thule PM, Taylor WR, Garcia AJ, (2010): Bioartificial matrices for therapeutic vascularization, *Proc Natl Acad Sci USA* ; 107: 3323-8

**Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284:143-7.

**Purleacher WC**, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA (1996): Femoral shaft reconstruction using tissue engineered growth of bone. *International journal of oral and maxillofacial surgery*; 25:223-8

**Quarto R**, Mastrogiacomo M, Cancedda R (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344:385-386



**Raiz L** (1999): Physiology and Pathophysiology of Bone Remodelling, Clinical Chemistry; 45: 1353-1358

**Ripamonti U** (1996): Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. Biomaterials; 17:31-35

**Rodrigues CVM**, Serricella P, Linhares A B R, Guerdes R M, Borojevic R, Rossi M A, Duarte M E L, Farina M (2003): Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials; 24: 4987-4997

**Rokn AR**, Khodadoostan MA, Ghahroudi AAR, Motahhary P, Fard MJKF, de Bruyn H, Afzalifar R, Soolar E, Soolari A (2011): Bone formation with two types of grafting materials: A histologic and histomorphometric study. The open dentistry journal; 5:96-104

**Rueger JM** (1998): Knochenersatzmittel, heutiger Stand und Ausblick. Der Orthopäde; 27:72-79

**Sauerbier S** (2011): Knochenregeneration erreichen. Implantology, Dental tribune international: <http://www.dental-tribune.com/>

**Scabbia A**, Trombelli L (2004): A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intraosseus defects. J Clin Periodontol; 31: 348-355

**Schenk RK**, Perren SM (1977): Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis. Hefte Unfallheilkunde ; 129: 29-41

**Schieker M**, Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W (2004): Tissue Engineering von Knochen, Integration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell, Orthopäde; 33: 1354 - 1360

**Schmidt-Rohlfing B**, Tzioupis C, Menzel SL, Pape HC (2009): Tissue Engineering von Knochengewebe, Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. Unfallchirurg; 112:785-795, Springer Medizin Verlag

**Schmitz JP**, Hollinger UJO (1986): □The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. □Clin. Orthop. Rel. Res; 205 : 299 – 308

**Schwartz Z**, Weesner T, van Dijk S (2000): Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. J Peridontol; 71: 1258-69

**Schnürer SM**, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ (2003): Knochenersatzwerkstoffe. Der Orthopäde 1; 32: 2-10



**Serre CM**, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G (1993): In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and /or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials*; 14: 97-106.

**Service RF** (2000): Tissue engineers build new bone. *Science*; 289:1498-500.

**Siddappa R**, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J (2007): Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering; *J Orthop Res*; 25:1029-41

**Smeets R**, Kolk A (2010): Osteokonduktive und –induktive Knochenersatzmaterialien, Zahnheilkunde Management Kultur: Online:

<http://www.zmk-aktuell.de/zahnheilkunde/implantologi/story/osteokonduktive-und-induktive-knochenersatzmaterialien-teil-1.html>

**Smith PK**, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150: 76-85

**Sommerfeldt DW**, Rubin CT (2001): Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*; 10: 86- 95

**Steck E**, Burkhardt M, Ehrlich H, Richter W (2010): Discrimination between cells of murine and human origin in xenotransplants by species specific genomic in situ hybridization. *Xenotransplantation*; 17: 153-159

**Stenderup K**, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003): Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*; 33: 919-926

**Stevens A**, Lowe J (1997): Histologie des Menschen; Chapman & Hall 2. Auflage

**Stolzing A**, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008): Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*; 129: 163-173

**Swetha M**, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N (2010): Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*; 47 :1-4

**Takahashi Y**, Tabata Y (2004) :Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym*; 15: 41-57

**Tapety FI**, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T (2004): A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss<sup>®</sup> in osteoblast differentiation and matrix synthesis. *Clin. Oral Impl. Res*; 15: 315-324

**Taylor JC**, Cuff SE, Leger JPL, Morra A, Anderson GI (2002): In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentations: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 17 : 321-330

**Terheyden H** (2000): Verwendung von Knochenersatzmaterialien in der chirurgischen Zahnheilkunde; DZZ: 2000:55

**Trecant M**, Delecrin J, Nguyen JM, Royer J, Passuti N, Daculsi G (1996): Influence of post- implantation physico- chemical changes in a macroporous ceramic on it's mechanical strength, Journal Mater Science Mater Medicine; 7:227-229

**Urist MR** (1994): The search for and the discovery of bone morphogenetic *protein* (BMP). Bone grafts, derivatives and substitutes; Butterworth-Heinemann, Oxford; 316

**Vacanti CA**, Kim W, Upton J, Mooney D, Vacanti JP (1995): The efficacy of periosteal cell compared to chondrocytes in the tissue engineered repair of bone defects. Tissue Eng 1; 301-308

**Vacanti JP**, Langer R, Upton J, Marler JJ (1998): Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration; Adv Drug Deliv Rev; 33: 165-82

**Van Gaalen SM**, Dhert WJA, van den Muysenberg A, Oner FC, van Vitterswijk C, de Bruijn JD (2004): Bone Tissue Engineering for Spine Fusion: An Experimental Study on Ectopic and Orthotopic Implants in rats. Tissue Engineering; 10: 1/2

**van Furth R**, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ; 46: 845–852

**Wahl DA**, Czernuska JT (2006): Collagen- Hydroxyapatite composites for hard tissue repair. eCells and Materials ; 11: 43-56

**Wang RZ**, Cui FZ, Lu HB, Wen HB, Ma CL, Li HD (1995): Synthesis of Nanophase Hydroxyapatite Collagen Composite. J Mater Sci Lett; 14:490-492

**Wiesner E**, Ribbeck R (1999): Lexikon Der Veterinärmedizin. 4. Auflage, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart

**Wippermann B**, Donow C, Schratt HE, den Boer FC, Blokhuis T, Patka P (1999): The influence of hydroxyapatite granules on the healing of a segmental defect filled with autologous bone marrow, Annales chirurgiae et gynaecologiae ;88: 194-7

**Wiltfang J**, Merten HA, Schlegel KA, Schultze- Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P (2002): Degradation characteristics of alpha and beta tricalcium-phosphate (TCP) in minipigs. J Biomed Mater Res; 63:115-21

**Winter A**, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W (2003): Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. Arthritis Rheum; 48: 418-429

**Xie J**, Baumann MJ, McCabe LR (2004): Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A*; 71: 108-117

**Yamauchi K**, Goda T, Takeuchi N, Einaga H, Tanabe T (2004): Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. *Biomaterials*; 25: 5481-5489

**Zecha PJ**, Schortinghuis J, van der Wal JE, Nagursky H, van der Broek KC, Sauerbier S, Vissink A, Raghoobar GM (2011): Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rat. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*; 40:533-542

**Zhang W**, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC (2004): Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* ; 13: 263-271

**Zou C**, Weng W, Deng X, Cheng K, Liu X, Du P, Shen G, Han G (2004): Preparation and characterization of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. *Biomaterials*; 26: 5276-5284

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Richter, die mir die Bearbeitung des äußerst interessanten Themas anvertraut hat und mir die Möglichkeit gegeben hat wissenschaftlich selbstständig zu arbeiten. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kam mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Patricia Janicki für ihre intensive Einarbeitung im Zellkulturlabor und in alle tierexperimentellen Methoden bedanken.

Herzlichen Dank an Dr. Mechthild Wagner- Ecker für ihre zahlreichen Tipps und die Unterstützung, die mir die Fertigstellung der Arbeit unendlich erleichterte.

Weiteren Dank möchte ich an dieser Stelle an alle meine Kolleginnen und Kolllegen des Forschungszentrums für Experimentelle Orthopädie für eine angenehme freundschaftliche und persönliche Arbeitsatmosphäre aussprechen, durch die mir die Arbeit sehr viel Spaß gemacht hat. Besonderen Dank schulde ich Simone Gantz für die statistische Beratung und Analyse, Jan Brocher für die Hilfe bei der Ausarbeitung des Manuskripts, Nicole Buchta und Pamela Kühlfluck für ihre ständige Unterstützung sowohl in methodischer als auch in menschlicher Hinsicht.

Ein besonderer dank gilt meiner Mutter für ihren liebevollen Beistand und ihr Verständnis in den letzten Jahren. Danke dafür, das sie immer das beste für mich tut und alles erdenkliche dazu bereit ist zu geben.

Ein herzliches Dankeschön meiner Tante Geraldine und meinem Onkel Hansfritz Voltz für die Hilfsbereitschaft und das Stück Lebenserfahrung das sie mir immer mit auf den Weg geben.

Bei Andi bedanke ich mich für die unermessliche Ausdauer, Ruhe und Geduld womit er mir stets zur Seite stand.

Ganz besonderer Dank geht an Loni und Dieter für jedwede Unterstützung und ihren großen Beistand.

Bei der Stiftung Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg und der Firma Geistlich Pharma für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.